

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULA DEBONI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA INDUZIDA POR FOSFOLIPASES-D  
RECOMBINANTES DE ARANHA-MARROM (GÊNERO *Loxosceles*): ÊNFASE NO  
EFEITO SOBRE A MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS**

Curitiba

2016

PAULA DEBONI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA INDUZIDA POR FOSFOLIPASES-D  
RECOMBINANTES DE ARANHA-MARROM (GÊNERO *Loxosceles*): ÊNFASE NO  
EFEITO SOBRE A MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS**

Monografia apresentada à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II como requisito parcial à conclusão do Curso de Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Senff Ribeiro

Co-orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Olga Meiri Chaim  
Me. Adriano Marcelo Morgon

Curitiba

2016

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais por todo o amor e carinho, pelo incentivo, confiança e paciência. Pra vocês todo o meu amor e admiração.

A minha irmã pelas brincadeiras, piadas e alegria, por ser meu exemplo e principal razão para que eu me torne uma pessoa cada dia melhor.

Aos meus avós, tias, primos e primas, pelo carinho, pela preocupação e por toda a experiência compartilhada.

Ao meu namorado, Guilherme, por toda a paciência, compreensão e apoio que demonstrou sempre com muito amor.

As minhas amigas, Amanda, Fernanda, Gabriela, Luiza e Nicoli pelo acolhimento, pelo ombro amigo, por todos os momentos de tristeza e alegrias compartilhados, obrigada por serem minha família em Curitiba.

Aos meus amigos Daia, Henrique, Adam, Lisley, Rafa, Júlio e todos os GRR2013 pela compreensão nos momentos difíceis, pelas várias risadas e pelo apoio durante o curso e o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus orientadores, Olga e Adriano, agradeço pela orientação, confiança, ajuda, empenho, paciência e a amizade. Vocês são exemplos de profissionais, minha gratidão e admiração.

Aos professores, Silvio e Andrea, pelo apoio e disponibilidade.

A todos do laboratório LME pela ajuda e ensinamentos compartilhados.

Aos professores do Curso de Biomedicina pelo conhecimento repassado.

Agradeço à todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

## RESUMO

As toxinas dermonecróticas da aranha-marrom (fosfolipases-D) são os constituintes do veneno loxoscélico melhor caracterizados do ponto de vista bioquímico e biológico. Quando estudadas isoladamente são capazes de reproduzir a maioria dos efeitos observados com o veneno total como lesões dermonecróticas, distúrbios hematológicos e nefrotoxicidade. Embora muitos estudos visem esclarecer o papel das fosfolipases-D no envenenamento, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos na sua toxicidade. Dessa forma, o objetivo geral do trabalho consistiu na compreensão dos mecanismos moleculares e respostas celulares promovidas pelas toxinas dermonecróticas (fosfolipase-D) de aranhas-marrons (*Loxosceles intermedia*) em células endoteliais. Para a realização do projeto foi inicialmente necessário obter as toxinas recombinantes utilizadas no estudo, para isso foram expressas duas isoformas de fosfolipases-D, LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A, em cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS e purificadas em resina NI-NTA Agarose onde foram obtidas de forma solúvel e com alto grau de pureza. Foi necessário verificar a atividade esfingomielinásica dessas isoformas para utilização das mesmas nos futuros teste, assim constatamos que a LiRecDT1 apresentou alta atividade catalítica, enquanto a LiRecDT1 H12A apresentou apenas atividade residual, já que a mesma possui uma importante mutação em seu sítio catalítico. Visando avaliar os efeitos citotóxicos das proteínas recombinantes em células endoteliais de aorta de coelho (RAEC), estas foram expostas às toxinas durante diferentes intervalos de tempo e analisadas quanto sua morfologia por microscopia de contraste de fase e viabilidade celular por ensaio de MTT, as células expostas a LiRecDT1 apresentaram vacuolização citoplasmática já na primeira hora de exposição e alteração de viabilidade no tempo de 2 horas, enquanto células expostas a isoforma mutada apresentaram alguns vacúolos citoplasmáticos no tempo de 24 horas de exposição, bem como perda de viabilidade celular neste mesmo intervalo de tempo. Para verificar a possível liberação de microvesículas por células endoteliais expostas a LiRecDT1, foi aplicado protocolo de centrifugação seriada no meio em que células controle e células expostas a LiRecDT1 foram cultivadas, o sedimento resultante foi submetido a técnicas *immunoblotting* para a identificação de marcadores de membrana presentes em microvesículas de células endoteliais. Não sendo possível essa identificação, o meio de cultivo das células foi precipitado com TCA, onde verificou-se em SDS-PAGE um perfil de bandas diferente do apresentado pelo sedimento, evidenciando a presença de uma maior quantidade de proteínas, mas ainda não foi possível identificar marcadores de membrana no precipitado. Dessa forma se faz necessário a padronização e o aperfeiçoamento de protocolos de isolamento e identificação das possíveis microvesículas que permitirá uma melhor compreensão de mecanismos moleculares desencadeados por fosfolipases-D de aranhas do gênero *Loxosceles* sobre o endotélio.

Palavras-chave: fosfolipases-D; células endoteliais; microvesículas endoteliais

## ABSTRACT

The brown-spider dermonecrotic toxins (phospholipases-D) are the best-characterized constituents of loxoscelic venom. When studied alone they are able to reproduce most of the effects observed with total venom such as dermonecrotic lesions, hematological disorders and nephrotoxicity. Although many studies aim to clarify the role of phospholipases-D after envenomation, little is known about the molecular mechanisms involved in their toxicity. Thus, the general objective of this work was to understand the molecular mechanisms and cellular responses promoted by phospholipases-D from brown spiders (*Loxosceles intermedia*) in endothelial cells. In order to carry out the project, it was necessary to obtain the recombinant toxins used in the study. Two isoforms of phospholipases-D, LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A, were expressed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS and purified using a Ni-NTA agarose resin, where they were obtained in a soluble form and with a high purity. It was necessary to assay the sphingomyelinase activity of these isoforms for their use in future tests, and we found that LiRecDT1 presented high catalytic activity, whereas LiRecDT1 H12A presented only a residual activity, due to an important mutation at its catalytic site. In order to evaluate the cytotoxic effects of the recombinant proteins upon rabbit aortic endothelial cells (RAEC), these cells were exposed to the toxins for different periods of time and we analysed their morphology by phase contrast microscopy and cell viability by MTT assay. Cells exposed to LiRecDT1 showed cytoplasmic vacuolization at the first hour of exposure and alteration of viability after 2 hours. On the other hand, cells exposed to the mutated isoform presented some cytoplasmic vacuoles, as well as loss of cell viability, only after 24 hours of exposure. To verify the possible release of microvesicles by endothelial cells exposed to LiRecDT1, a serial centrifugation protocol was applied in the medium in which control cells and cells exposed to LiRecDT1 were cultured. The resulting sediment was used to perform immunoblotting techniques to identify membrane markers present in endothelial cell microvesicles. This identification was not possible, therefore, the cell culture medium was precipitated with TCA, where by SDS-PAGE it showed a different band profile than that presented by the sediment, evidencing the presence of a greater amount of proteins. However, it was not possible to identify membrane markers in this precipitate. Thus, it is necessary to standardize and improve protocols for isolation and identification of possible microvesicles, which will allow for a better understanding of the molecular mechanisms triggered by phospholipases-D of *Loxosceles* spiders upon the endothelium.

Keywords: phospholipases-D; endothelial cells; endothelial microvesicles

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
1.1 JUSTIFICATIVA .....	8
1.2 OBJETIVOS .....	9
1.2.1 OBJETIVO GERAL .....	9
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>11</b>
2.1 GÊNERO <i>Loxosceles</i> .....	11
2.2 LOXOSCELISMO .....	12
2.3 VENENO LOXOSCÉLICO.....	13
2.4 FOSFOLIPASES – D .....	15
2.5 MICROVESÍCULAS ENDOTELIAIS.....	18
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
3.1 EXTRAÇÃO DO VENENO .....	21
3.2 TRANSFORMAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES EM <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.....	21
3.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES ...	22
3.4 ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES <i>IN VITRO</i> .....	23
3.5 CULTIVO CELULAR .....	23
3.6 MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE.....	24
3.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR.....	25
3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	25
3.9 EXTRATO CELULAR .....	26
3.10 ISOLAMENTO DE MICROVESÍCULAS A PARTIR DE CÉLULAS ENDOTELIAIS CULTIVADAS .....	26
3.11 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS DO MEIO DE CULTIVO DE CÉLULAS EXPOSTAS AS TOXINAS COM ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (TCA) .....	27
3.12 SDS-PAGE.....	27
3.13 IMMUNOBLOTTING.....	28
3.14 DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD .....	29
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
<b>4.1 RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>

4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS TOXINAS LiRecDT1 E LiRecDT1 H12A .	31
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LiRecDT1 E LiRecDT1 H12A <i>IN VITRO</i> .....	33
4.3 EFEITO DA LiRecDT1 E LiRecDT1 H12A NA MORFOLOGIA E VIABILIDADE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS .....	33
4.4 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE RAEC.....	40
4.5 IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES DE MEMBRANAS EM EXTRATO CELULAR E EM CONTEÚDOS PROTEICOS LIBERADOS PARA O MEIO DE CULTIVO POR CELULAS ENDOTELIAIS EXPOSTAS A LiRecDT1.....	41
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As aranhas do gênero *Loxosceles* são popularmente conhecidas como aranhas-marrons devido a sua coloração que varia de marrom claro a marrom escuro. Apresentam-se de forma endêmica no Sul e no Sudeste do país sendo que o Estado do Paraná registra o maior número de acidentes com aranhas desse gênero. As espécies de maior importância médica são *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*, sendo que a *L. intermedia* é a espécie mais abundante no estado do Paraná e principalmente na cidade de Curitiba e Região Metropolitana (MALAQUE *et al.*, 2002).

O conjunto de sinais e sintomas decorrentes dos acidentes com espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* são denominados loxoscelismo, e podem se apresentar de duas formas distintas: loxoscelismo cutâneo e loxoscelismo sistêmico. O quadro cutâneo é caracterizado por uma lesão dermonecrotica no local da picada com espalhamento gravitacional acompanhado de edema e eritema. Enquanto no loxoscelismo sistêmico, quadro menos frequente, porém de maior gravidade, o paciente pode apresentar febre, fraqueza, vômitos, insuficiência renal e distúrbios hematológicos (FUTRELL, 1992).

O veneno loxoscélico é um líquido cristalino e incolor, composto principalmente por proteínas com ação tóxica e/ou enzimática, responsáveis pelo desenvolvimento dos sinais e sintomas do loxoscelismo (DA SILVA *et al.*, 2004). Análises eletroforéticas revelaram predominância de moléculas de baixa massa molecular, e ainda análises dos transcritos presentes na glândula produtora de veneno pressupõe que o mesmo é enriquecido por três famílias moleculares: peptídeos potencialmente inseticidas, metaloproteases do tipo astacinas e fosfolipases-D (GREMSKI *et al.*, 2010).

As fosfolipases-D de aranhas do gênero *Loxosceles* (30 - 35kDa), são as enzimas que se encontram melhor caracterizadas em relação a sua estrutura e atividade bioquímica e biológica (CHAIM *et al.*, 2011b; GREMSKI *et al.*, 2014). São também conhecidas como proteínas dermonecroticas devido sua capacidade de induzir a dermonecrose (APPEL *et al.*, 2005). Quando estudadas isoladamente são capazes de reproduzir a maioria dos outros efeitos observados com o veneno total como hemólise, agregação plaquetária, distúrbio renal, aumento na permeabilidade vascular e resposta inflamatória (RIBEIRO *et al.*, 2007; DA SILVA *et al.*, 2004). Ainda sua ação sobre fosfolipídios de membrana libera mediadores lipídicos bioativos que



desempenham um papel importante em vias de sinalização complexas, as quais controlam várias dinâmicas celulares além de estarem envolvidos em vários processos fisiopatológicos (CHAIM *et al.*, 2011a).

Muitos estudos visando a compreensão dos eventos inflamatórios apresentados no loxoscelismo têm utilizado células endoteliais como modelo, pois quando ativadas são capazes de recrutar uma série de células inflamatórias, especialmente leucócitos polimorfonucleares para o local de lesão. Tendo em vista ainda a ação de fosfolipases sobre células endoteliais, busca-se a compreensão dos efeitos induzidos por isoformas dessa toxina associados à inflamação (CHAIM *et al.*, 2011a; VEIGA *et al.*, 2001b)

Recentemente, tem-se reportado sobre a produção de microvesículas por células endoteliais em processos inflamatórios. Essas microvesículas (MVs) são fragmentos de membrana de diâmetro de 100 e 1000 nm, liberados a partir da membrana plasmática de células viáveis ou danificadas. São constituídas, principalmente, de diferentes lipídios e proteínas de membrana similares àqueles presentes na célula da qual se originam e transportam moléculas do meio citoplasmático da célula de origem, servindo como um importante meio de comunicação intracelular (HUANG *et al.*, 2015; RAPOSO E STOORVOGEL, 2013).

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista os sinais e sintomas desenvolvidos nos quadros de loxoscelismo, e ainda por acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* serem um problema de saúde pública no estado do Paraná, muitos estudos vem sendo desenvolvidos com o objetivo de identificar componentes do veneno e os mecanismos fisiopatológicos por eles desenvolvidos (VEIGA *et al.*, 2000a; DA SILVA *et al.*, 2004; PALUDO *et al.*, 2006).

Logo após a picada, é possível verificar reação inflamatória no local onde há o acúmulo de células inflamatórias com a massiva diapedese de neutrófilos, deposição de fibrina nos vasos sanguíneos danificados e a desorganização nas fibras de colágeno (CHAIM *et al.*, 2011b). Porém os eventos inflamatórios, local e sistêmicos, desencadeado pelas fosfolipases-D ainda não são completamente compreendidos, sendo que a amplificação desse sinal ocorre de forma rápida e dependente de inúmeros fatores, como a quantidade da toxina a qual o objeto de estudo foi exposto.

E ainda tendo conhecimento que as fosfolipases são capazes de interagir com células endoteliais, e que estas são capazes de expressar uma série de moléculas envolvidas na regulação da hemostasia, além de alterarem seu fenótipo para promover as etapas envolvidas na inflamação, busca-se entender a relação das fosfolipases e resposta inflamatória ocorrida no local da picada, bem como a nível sistêmico.

Com isso, um dos objetivos do trabalho foi verificar se células endoteliais expostas a isoformas recombinantes da toxina dermonecrótica induzem a formação de microvesículas. Uma vez que, estudos recentes sugerem que estas microvesículas são importantes fatores de comunicação entre células desempenhando um papel importante em diversos processos fisiológicos e patológicos, como a modulação da inflamação, pois são capazes de carregar e transferir moléculas relacionadas a estes processos (LEROYER *et al.*, 2010).

A identificação e caracterização das principais vias de sinalização ativadas pela exposição ao veneno e fosfolipases-D recombinantes contribuirá para determinação de moléculas envolvidas em eventos inflamatórios e sua possível inibição. Da mesma forma, que fosfolipases podem ainda servir como objetos de estudo da comunicação intercelular via membranas celulares no contexto da inflamação.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 OBJETIVO GERAL

Compreender mecanismos moleculares e respostas celulares promovidas pelas toxinas dermonecróticas (fosfolipase-D) de aranhas-marrons (*Loxosceles intermedia*) em células endoteliais.

### 1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção de fosfolipases-D recombinantes (LiRecDT1, LiRecDT1 H12A) solúveis e ativas para estudos funcionais;
- Avaliação do efeito citotóxico de fosfolipases-D em células endoteliais por análises morfológicas e de viabilidade celular;

- Analisar as alterações morfológicas, com ênfase nas membranas celulares, induzidas pelo efeito de fosfolipases-D e veneno total de *L. intermedia* em linhagem de células endoteliais de aorta de coelho mantidas em cultivo celular por técnicas de microscopia;
- Avaliar a possível formação e liberação de microvesículas relacionadas à eventos de membrana decorrentes da ação de fosfolipases-D de *L. intermedia* em células endoteliais mantidas em cultivo celular.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 GÊNERO *Loxosceles*

As aranhas pertencentes ao gênero *Loxosceles* são encontradas em diversos continentes, o qual conta com mais de 100 espécies descritas. Apenas no Brasil, existem doze destas. Entretanto, nas regiões Sul e Sudeste do país, as espécies predominantes são *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* tendo uma importância significativa relacionada ao quadro clínico de envenenamento (MALAQUE *et al.*, 2002).

As aranhas do gênero *Loxosceles* são popularmente conhecidas como aranhas-marrons devido a sua coloração, que varia de marrom claro a marrom escuro, ou também como aranhas-violino por apresentarem um desenho no cefalotórax semelhante a este instrumento (FUTRELL, 1992; VETTER E VISSCHER, 1998). Morfologicamente, de modo geral, são aranhas de pequeno porte com o corpo medindo de 8 a 15 mm e as patas entre 8 e 30 mm. Também apresentam dimorfismo sexual, no qual fêmeas possuem o corpo maior e as pernas mais curtas quando comparadas com machos (CHAIM *et al.*, 2011b). Outro método de identificação é pela disposição dos olhos, possuem seis olhos arranjados em pares sobre o cefalotórax formando um semicírculo (VETTER E VISSCHER, 1998) (FIGURA 1).

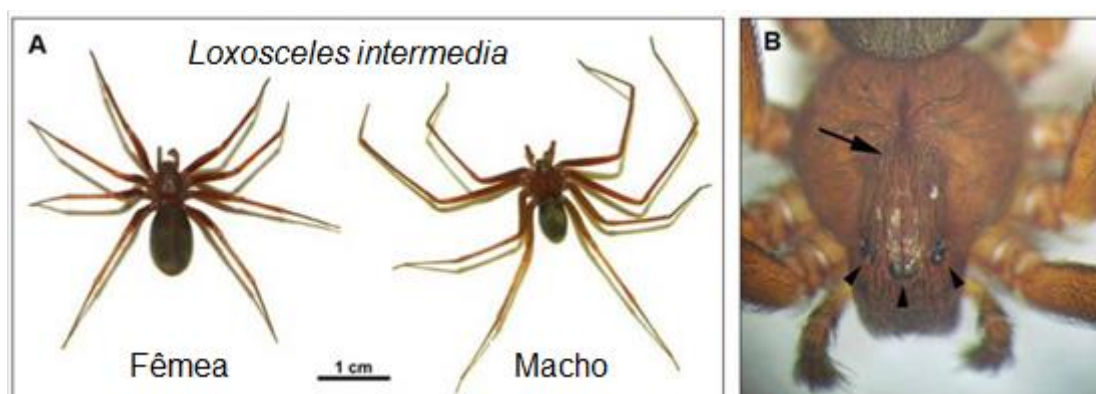


FIGURA 1 – ARANHAS DA ESPÉCIE *Loxosceles intermedia*. (A) Dimorfismo sexual nas aranhas *Loxosceles*. (B) desenho semelhante a um violino na região dorsal do cefalotórax de aranhas do gênero *Loxosceles* (seta); disposição característica dos olhos: seis olhos distribuídos em pares (pontas de seta) Adaptado de Chaim *et al.*, 2011b.

Aranhas do gênero *Loxosceles* não são agressivas, atacam quando se sentem ameaçadas como forma de defesa, alimentam-se de pequenos insetos,

possuem hábitos noturnos, reproduzem-se com facilidade mesmo em condições desfavoráveis e sobrevivem a temperaturas que variam de 8°C a 43°C. Por se adaptarem a diferentes condições de vida estão frequentemente presentes em ambientes domiciliares podendo viver até 7 anos, aumentando assim o número de acidentes com humanos (FUTRELL, 1992).

## 2.2 LOXOSCELISMO

Loxoscelismo é o termo utilizado para caracterizar os sinais e sintomas clínicos apresentados pelo indivíduo após a picada de uma aranha do gênero *Loxosceles* (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2011a). O loxoscelismo pode se apresentar de duas formas distintas: quadro cutâneo e quadro sistêmico. O desenvolvimento de um dos quadros ou de ambos e a gravidade dos quadros depende de diversos fatores relacionados tanto ao acidentado quanto às características da aranha. Exemplos desses fatores são: a quantidade de veneno inoculado (FUTRELL, 1992), estado nutricional e idade da vítima, bem como a região corporal da picada (BARBARO *et al.*, 1994), além de espécie, sexo e estágio de desenvolvimento da aranha (MALAQUE *et al.*, 2011).

O loxoscelismo cutâneo, quadro clínico mais comum, é caracterizado principalmente pelo aparecimento de uma lesão dermonecrotica que se espalha gravitacionalmente a partir do local da picada. A picada é pouco dolorosa, e na maioria dos casos, passa despercebida pelo paciente. Porém, após 2 a 8 horas, a dor pode variar de moderada à severa, com ardência local e edema (FUTRELL, 1992; HOGAN *et al.*, 2004). Nesse momento, a lesão é denominada de placa marmórea por existirem regiões avermelhadas (devido à dilatação dos capilares) entre áreas pálidas (devido à isquemia do tecido) (HOGAN *et al.*, 2004). Em alguns casos, a lesão cutânea necrótica evolui em 2 a 6 semanas, com formação de uma escara de difícil cicatrização que pode dar origem a sequelas deformantes e severas (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004) (FIGURA 2).

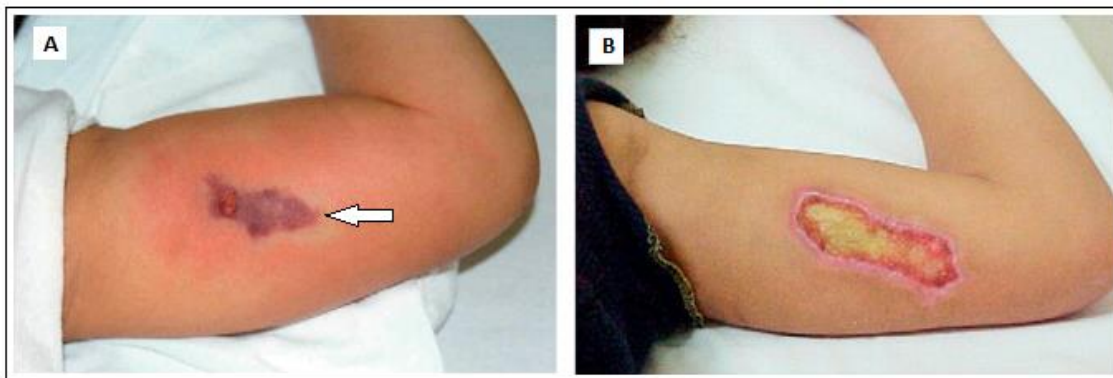


FIGURA 2 – LESÃO DERMONECRÓTICA CAUSADA PELA PICADA DE ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles*. (A) Lesão formada 24 horas após a picada, evidenciando eritema, edema e placa marmórea (seta). (B) Úlcera formada 25 dias após a picada, evidenciando a necrose do tecido no local do acidente. Adaptado de Isbister e Fan, 2011.

O loxoscelismo sistêmico, menos frequente do que as lesões cutâneas, é a principal causa de morte relacionada ao envenenamento (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; CHAIM *et al.*, 2006). Pode incluir sintomas como febre, fraqueza, vômitos, cefaleias, alterações sensoriais e, nos casos graves, pode ocorrer hemólise, coagulação intravascular disseminada e falência renal aguda (DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; MALAQUE *et al.*, 2011).

### 2.3 VENENO LOXOSCÉLICO

O veneno loxoscélico, líquido incolor e cristalino, é uma mistura complexa composta principalmente por enzimas, proteínas não enzimáticas e peptídeos com atividades biológicas distintas. É produzido por um par de glândulas situadas no cefalotórax da aranha que se comunicam com o exterior por um par de quelíceras (aparelho inoculador) (DA SILVEIRA *et al.*, 2002). A quantidade de veneno produzido varia de acordo com a disposição de alimentos, tamanho, sexo e espécie do animal, porém o volume médio inoculado é de aproximadamente 4  $\mu$ l, com uma quantidade proteica total que varia de 20  $\mu$ g a 200  $\mu$ g (SAMS *et al.*, 2001; TAMBOURGI *et al.*, 2010). São produzidos pelas aranhas com a função de paralisia da presa e/ou autodefesa (DA SILVA *et al.*, 2004).

Análises eletroforéticas demonstraram que o veneno é enriquecido com moléculas de baixa massa molecular (1 a 45 kDa) sendo que proteínas de alta massa molecular são expressas em quantidades menores (FIGURA 3) (VEIGA *et al.*, 2000; GREMSKI *et al.*, 2010). Acredita-se que a toxicidade do veneno da aranha esteja

associada ao efeito combinado ou sinérgico de seus constituintes (DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Dessa forma a identificação das toxinas tem sido foco de muitos estudos, sendo que algumas toxinas já foram identificadas e caracterizadas biologicamente (DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Dentre elas podem ser citadas: fosfolipases-D, serinoproteases, hialuronidases, metaloproteases e peptídeos com atividade inseticida (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000a; VEIGA *et al.*, 2000b; VEIGA *et al.*, 2001; YOUNG E PINCUS, 2001; DA SILVA *et al.*, 2004; DE CASTRO *et al.*, 2004; BARBARO *et al.*, 2005; DA SILVEIRA *et al.*, 2007).

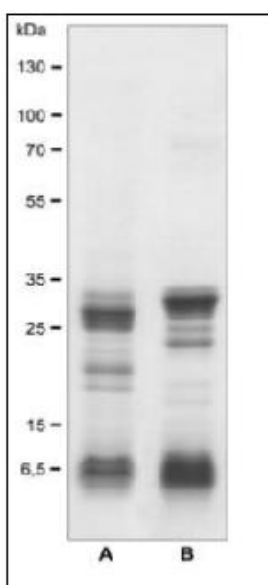


FIGURA 3 – SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS PRESENTES NO VENENO DE *L. intermedia* POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA – SDS-PAGE. (A) Amostra não reduzida. (B) Amostra reduzida. Os números a esquerda correspondem a massa dos marcadores em kDa. Adaptado de Gremski *et al.*, 2010.

Mais recentemente, através da análise dos transcritos presentes nas glândulas produtoras de veneno de *L. intermedia* foi possível determinar a existência de novos grupos de toxinas e as proporções para as toxinas (GREMSKI *et al.*, 2010), tais como metaloproteases do tipo astacina, peptídeos potencialmente inseticidas, alérgenos, proteína tumoral controlada traducionalmente (TCTP), inibidores de serinoproteases e neurotoxinas similares a Magi-3. Adicionalmente, os resultados mostraram que três classes de toxinas encontradas nas glândulas de veneno são altamente expressas. Sendo estas: peptídeos potencialmente inseticidas (55,9 % dos transcritos de toxinas), metaloproteases do tipo astacina (22,6 %) e fosfolipases-D (20,2 %) (FIGURA 4).

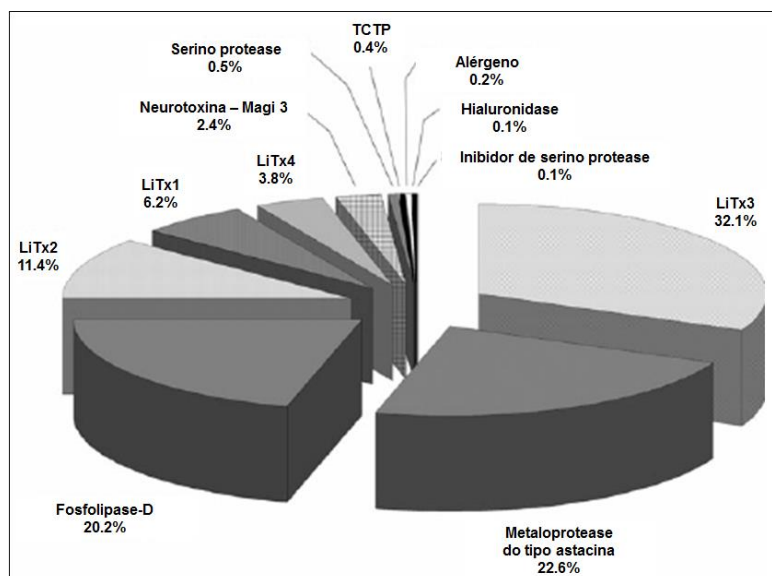


FIGURA 4 – TRANSCRIPTOMA DA GLÂNDULA DE VENENO DE *L. Intermedia*. Proporções relativas de cada grupo de toxinas em relação ao total de transcritos codificadores de toxinas gerados. Adaptado de Gremski *et al.*, 2010.

Do ponto de vista biológico por meio de ensaios *in vivo*, utilizando coelhos como modelo de estudo, verificou-se que o veneno loxoscélico induziu o desenvolvimento de uma lesão dermonecrótica com típico espalhamento gravitacional. Ainda análises histopatológicas de peles de coelho expostos ao veneno total apresentaram vacúolos subendoteliais, degeneração da membrana celular, formação de fibrina e trombos e acumulação massiva de leucócitos polimorfonucleares, dentro e ao redor dos vasos (VEIGA *et al.*, 2001b; ZANETTI *et al.*, 2002). Paludo e colaboradores (2006), ao expor células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) ao veneno de *L. intermedia*, verificaram que as mesmas sofreram alterações morfológicas como retração celular, aumento de filopódios, desadesão da matriz extracelular, e formação de estruturas globulares na superfície celular. Além disso, foi verificado que esses efeitos citotóxicos diretos podem levar a ativação de leucócitos e plaquetas e aumento da permeabilidade de vasos.

## 2.4 FOSFOLIPASES – D

As fosfolipases – D (30 – 35 kDa) são os constituintes do veneno de aranhas da espécie *Loxosceles* mais estudados e que se encontram melhor caracterizados do ponto de vista biológico e bioquímico (CHAIM *et al.*, 2011b). São ainda denominadas proteínas dermonecróticas, devido sua principal atividade biológica de induzir dermonecrose (APPEL *et al.*, 2005). Quando estudadas isoladamente são capazes



de reproduzir a maioria dos efeitos observados com o veneno total, como: aumento da permeabilidade vascular, intensa resposta inflamatória no local de inoculação do veneno e em nível sistêmico, agregação plaquetária, hemólise e nefrotoxicidade além da dermonecrose como citado anteriormente (APPEL *et al.*, 2005; DA SILVEIRA *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007; KUSMA *et al.*, 2008; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; CHAIM *et al.*, 2011b).

Eram inicialmente denominadas esfingomielinases – D devido a sua capacidade de catalisar a hidrólise de esfingomielina, porém estudos posteriores sugeriram que a melhor nomenclatura para essa família de toxinas seria fosfolipases – D, pois glicerofosfolípidos e lisofosfolípidos também eram alvos da atividade catalítica destas enzimas (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2007; CHAIM *et al.*, 2011a).

Várias isoformas desta toxina já foram caracterizadas nos venenos loxoscélicos, e demonstrou-se que há um alto nível de identidade entre elas, assim sendo denominadas de família *Loxtox* (*Loxosceles toxin*) por alguns autores (KALAPOTHAKIS, 2007). No veneno de *Loxosceles intermedia*, 7 isoformas de fosfolipases foram identificadas e clonadas. Chaim e colaboradores (2006) clonaram e expressaram uma toxina dermonecrótica funcional denominada LiRecDT (*Loxosceles intermedia Recombinant Dermonecrotic Toxin*). Em seguida, foi identificada a existência das isoformas LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT4, LiRecDT5, LiRecDT6 e mais recentemente a isoforma 7 (DA SILVEIRA *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2007; APPEL *et al.*, 2008; VIUTIKA *et al.*, 2013). Apesar das isoformas apresentarem sequências aminoacídicas semelhantes e conservação dos aminoácidos no sítio catalítico, estas possuem atividades bioquímicas e biológicas diferenciadas, provavelmente devido a diferenças estruturais que implicam consequências sobre a afinidade de substrato e atividade enzimática das mesmas. (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2007).

Giuseppe e colaboradores (2011) descreveram a estrutura tridimensional de uma fosfolipase-D recombinante de *L. intermedia*, denominada LiRecDT1. Esta enzima possui a forma de TIM barril ( $\alpha - \beta$ ) 8 e 3 *loops* denominados loops catalítico, flexível e variável. O *loop* catalítico (resíduos 46 - 60) contém os resíduos de His12 e His47 que juntamente com o íon  $Mg^{+2}$  formam o sítio catalítico capaz de hidrolisar esfingomielina. Apresentam duas pontes dissulfeto, nos aminoácidos Cys51 e Cys57 e nos aminoácidos Cys53 e Cys201, ligando o *loop* flexível ao loop catalítico.

O mecanismo catalítico sugerido para o processo de hidrólise acontece em duas etapas e é classificado como do tipo ácido-base onde combina a coordenação do íon metal e há a participação da His12 e da His47. Na primeira etapa a His47 inicia o processo de hidrólise na ligação fosfodiéster do fosfolípido, ela realiza um ataque nucleófilo formando um estrutura penta coordenada, já a His12 doa um próton pra estrutura penta coordenada gerando a colina. Na segunda etapa a His12 que está desprotonada retira um átomo de hidrogênio da molécula de água iniciando um segundo ataque nucleófilo sobre o intermediário da reação formando os produtos secundários (MURAKAMI *et al.*, 2006).

Estudos anteriores realizaram uma mutação sitio dirigida na isoforma LiRecDT1 com o objetivo de determinar se a atividade da fosfolipase-D está diretamente relacionada ao seus efeitos biológicos. Dessa forma a LiRecDT1 H12A, forma mutada da LiRecDT1, possui uma mutação sitio dirigida em um aminoácido do sitio catalítico, no qual a histidina na posição 12 foi substituída por uma alanina, demonstrado que essa alteração foi capaz de diminuir a atividade catalítica, reduzindo consideravelmente a atividade dermonecrótica, hemolítica e a resposta inflamatória. Porém ainda ocorre ligação da proteína mutada na superfície celular ou em lipídios mobilizados, mostrando que muito provavelmente outros domínios da toxina foram conservados (KUSMA *et al.*, 2008; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; CHAIM *et al.* 2011b; WILLE *et al.*, 2013)

Tendo em vista a importância das fosfolipases sobre uma grande variedade de distúrbios apresentados no loxoscelismo e com base na sua atividade catalítica sobre esfingolipídios, glicerofosfolipídios e lisofosfolipídios, onde hidrolisa preferencialmente esfingomiélin e lisofosfatidilcolina em um processo tempo-dependente liberando como subprodutos mediadores lipídicos, muitos estudos tem buscado relacionar a atividade enzimática das fosfolipases e a liberação de mediadores lipídicos com os eventos biológicos que esses metabólitos são capazes de regular (LEE e LYNCH, 2005; LAJOIE *et al.*, 2013).

O ácido lisofosfatídico (LPA), liberado a partir da hidrólise da lisofosfatidilcolina, induz diversas respostas biológicas ou patológicas por meio da interação com receptores acoplados à proteína - G, como agregação plaquetária, hiperpermeabilidade endotelial e respostas pró inflamatórias (LEE E LYNCH, 2005). Também está envolvido em uma serie de respostas biológicas dependente do tipo de receptor com o qual interage como proliferação, sobrevivência e migração celular,

além de rearranjo do citoesqueleto e mobilização de cálcio (HOUBEN E MOOLENAAR, 2011)

A ceramida-1-fosfato (C1P), outro produto secundário da atividade enzimática de fosfolipases, é produzida diretamente pela hidrólise de esfingomielina presente na membrana plasmática e é capaz de estimular a liberação de ácido araquidônico e a formação de prostaglandina E2 (PETTUS *et al.*, 2003). Por isso, supõe-se que a C1P tenha papel no quadro inflamatório induzido pelas fosfolipases - D loxoscélicas, uma vez que pode induzir a síntese moléculas pró - inflamatórias como interleucinas entre outras citocinas (CHAIM *et al.*, 2011a; DRAGULEV *et al.*, 2007).

Sugerindo que as fosfolipases - D são responsáveis pela maioria dos efeitos observados com o veneno total de *L. intermedia* diferentes tipos celulares foram expostos a toxinas com diferentes objetivos. As células da linhagem RAEC expostas à LiRecDT1 apresentaram vacuolização citoplasmática, redução do volume celular, e foi verificado a presença de *debris* celulares no meio de cultivo resultante da lise das mesmas, alterações similares àquelas expostas ao veneno total. Além disso, foi verificado que a LiRecDT1 é capaz de se ligar à superfície de células da linhagem RAEC de maneira tempo-dependente (CHAIM *et al.*, 2011a), corroborando resultados semelhantes obtidos com o veneno de *L. intermedia*, onde foi verificado que toxinas do veneno interagem com a superfície celular das células da linhagem RAEC (NOWATZKI *et al.*, 2010).

Eritrócitos humanos expostos à LiRecDT1 sofreram alterações morfológicas e estruturais tais como alteração da fluidez da membrana, translocação de fosfatidilserina para o folheto extracelular e agregação de microdomínios ricos em colesterol (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009). E ainda verifica-se o aumento de cálcio intracelular em células de linhagem tumoral e em eritrócitos expostos a LiRecDT1, associando tal evento com a atividade catalítica da enzima e a liberação de mediadores lipídicos capazes de regular uma série de respostas biológicas, entre elas a mobilização de cálcio (WILLE *et al.*, 2013; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011).

## 2.5 MICROVESÍCULAS ENDOTELIAIS

O endotélio é capaz de responder a uma série de sinais químicos e físicos com a produção de diversos fatores envolvidos na proliferação celular, controle do tônus vascular e fluxo sanguíneo e modulação de respostas inflamatórias. Estudos

recentes sugerem ainda que os mesmos são capazes de liberar microvesículas (MVs) em respostas a ativação celular ou apoptose (LEROYER *et al.*, 2010).

As microvesículas, também conhecidas como micropartículas, são estruturas vesiculares com diâmetro heterogêneo, variando de 100 a 1000 nm. Originam-se através do desprendimento direto da membrana plasmática em um processo denominado *shedding* e possuem antígenos representativos de suas células precursoras (COCUCCI *et al.*, 2009). Não devem ser confundidas com os exossomos, estruturas de origem subcelular e de tamanho menor, com diâmetro entre 40 a 100 nm de (RAPOSO E STOORVOGEL, 2013).

De um modo geral as MVs carregam componentes citosólicos como proteínas, lipídios, fatores de transcrição, RNAs e microRNAs, citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, entre outras, representando um importante modo de comunicação intercelular, servindo como veículo para a transferência destas moléculas sinalizadoras para as células vizinhas (HUANG *et al.*, 2015; RAPOSO E STOORVOGEL, 2013).

A composição das MVs varia de acordo com a célula de origem e o tipo de estímulo que induziu sua formação. Microvesículas derivadas do endotélio expressam principalmente marcadores envolvidos na adesão celular e inflamação, como CD62E (E-selectina), CD62P (P-selectina), ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), PECAM-1 (molécula de adesão celular endotelial plaquetária), CD105 (endoglina), CD144 (VE-caderina) e vWF (*Von Willebrand fator*) (DIGNAT-GEORGE; BOULANGER, 2010).

Dessa forma estudos realizados com células endoteliais *in vitro* mostraram que as mesmas são capazes de liberar MVs após ativação por uma série de estímulos prolongados e especialmente por estímulos inflamatórios, como por exemplo exposição a citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio, lipopolissacarídeo (LPS) e proteína C reativa (SZOTOWSKI *et al.*, 2007; PEREZ-CASAL, 2005).

Tendo em vista o conteúdo citosólico que carregam e a presença de moléculas de adesão as MVs derivadas do endotélio podem se ligar a outros tipos celulares transferindo moléculas bioativas, participando da amplificação de resposta inflamatórias (SABATIER, 2002). Essa transferência de conteúdo ocorrer devido a interação dessas MVs com a superfície de outras células através de receptores, dessa forma as MVs podem fusionar-se após a interação ou podem ser endocitadas, no

entanto, a interação das vesículas com outras células é específica (COCUCCI *et al.*, 2009).

Microvesículas endoteliais são detectáveis no plasma de indivíduos saudáveis, porém seu aumento pode estar relacionado a condições patológicas associadas com aumento do risco trombótico e disfunção endotelial (LEROYER *et al.*, 2010). De maneira geral, as MVs são capazes de cair na circulação sanguínea sendo então importantes transportadores e transdutores de sinais em uma distância notável do seu lugar de origem e não só no ambiente local. Quando liberadas em fluidos biológicos como o plasma, urina, fluido cefalorraquidiano, podem ser utilizadas como potenciais biomarcadores para diversas doenças (CARANDINI *et al.*, 2015; GALINDO-HERNANDEZ *et al.*, 2013).

O conhecimento atual sobre a formação de MV endoteliais deriva principalmente de ensaios utilizando células endoteliais cultivadas isoladamente. Os mecanismos *in vivo* envolvidos na geração de MV são pouco esclarecedores (LEROYER *et al.*, 2010).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 EXTRAÇÃO DO VENENO

O veneno total de *L. intermedia* foi obtido de aranhas adultas capturadas do ambiente, mantidas em condições apropriadas (água *ad libitum* e temperatura ambiente) e submetidas à eletrochoque de 15 volts no cefalotórax, conforme descrito por Feitosa e colaboradores (1998). Posteriormente, o veneno foi avaliado quanto ao conteúdo proteico por microensaio adaptado de Bradford (1976) e mantido a -80°C até o uso.

#### 3.2 TRANSFORMAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES EM *E. coli* BL21(DE3)pLysS

As toxinas utilizadas nesse trabalho foram produzidas a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de *L. intermedia*, segundo protocolo de Chaim e colaboradores (2006).

As construções em vetor de expressão pET-14b da toxina dermonecrótica (LiRecDT1) e da isoforma com mutação sítio dirigida com atividade enzimática residual (LiRecDT1 H12A) (Chaves-Moreira *et al.*, 2009; Chaim *et al.*, 2011a) foram transformadas por eletroporação em cepa bacteriana eletrocompetente *E. Coli* BL21(DE3)pLysS. Após a transformação as bactérias passaram por uma fase de recuperação em meio SOC (triptona 20 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,5 g/L; KCl 2,5 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; MgSO<sub>4</sub> 10 mM; glicose 0,2 M) a 37°C por 1 hora sob agitação de 200 rpm. Em seguida, foi realizado o plaqueamento das mesmas em duas placas contendo meio LB ágar (triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; ágar-ágar 15 g/L), ampicilina (100 µg/ml) e cloranfenicol (34 µg/ml), sendo a primeira placa referente a uma fração de 100 µL da solução contendo as bactérias transformadas, e a segunda placa referente a 900 µL. O plaqueamento foi realizado com alça de Drigalski e as placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. Protocolo adaptado de Chaves-Moreira e colaboradores (2009) e Chaim e colaboradores (2011a).

### 3.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES

Após a transformação, as proteínas recombinantes foram expressas fusionadas a uma cauda de 6 histidinas na região N-terminal, em *E. coli*/BL21(DE3)pLysS. Para isso, foram realizados dois pré-inóculos, referentes as duas isoformas da toxina, contendo 12 ml de meio LB-líquido (triptona 10 g/l; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/l), ampicilina (100 µg/ml) e cloranfenicol (34 µg/ml), a partir de uma colônia isolada das placas obtidas após a transformação com as sequencias de interesse. Cada pré-inóculo foi incubado a 37°C por 16 horas sob agitação constante de 200 rpm. Após o crescimento das culturas, foram realizados inóculos a partir das amostras anteriores utilizando a razão 1:100 (cultura do pré-inóculo : meio LB-líquido). Quando a cultura atingiu densidade óptica entre 0.4 e 0.6 medida em 550 nm, foi realizada a indução da expressão das proteínas recombinantes pela adição 0,05 mM de β-D-thiogalactopiranosídeo (IPTG) a 30°C por 3,5 horas. Foram coletadas amostras nos tempos inicial (T0h) e final (T3,5h) de expressão para futura avaliação da expressão, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 4000 xg, a fração solúvel de cada amostra foi descartada e o precipitado resultante foi congelado a -20°C. Após o tempo de expressão, as culturas foram resfriadas em banho de água/gelo e centrifugadas por 7 minutos a 7000 xg. O precipitado foi ressuspensionado em tampão de ligação (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 10 mM) e cada amostra foi incubada com lisozima 1 mg/ml por 30 minutos a 4°C. As amostras foram submetidas a lise mecânica em prensa *French Press* (4 ciclos de 1000 psi cada) e centrifugadas a 9000 xg por 30 minutos. A fração solúvel foi separada do precipitado e ambos foram mantidos a 4°C até o passo de purificação.

Para purificação, a fração solúvel resultante da lise das bactérias foi incubada com resina de Ni-NTA Agarose, previamente equilibrada com tampão de ligação (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 10 mM), por 1 hora a 4°C sob agitação de 6 rpm. Em seguida a suspensão resina/proteína recombinante foi levada a uma coluna cromatográfica e submetida a sucessivas lavagens com tampão de lavagem (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 20 mM) até a densidade óptica em 280 nm atingir a leitura de 0,01. As proteínas recombinantes foram então eluídas com tampão de eluição (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 250 mM) e dialisadas contra tampão PBS (KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7,2) para a retirada do imidazol. A análise de expressão das

proteínas de interesse e purificação foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5 % sob condições redutoras e posteriormente, as proteínas foram dosadas por microensaio adaptado de Bradford. Protocolo adaptado de Chaim e colaboradores (2011a) e Chaves-Moreira e colaboradores (2009).

### 3.4 ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES *IN VITRO*

A atividade das toxinas dermonecróticas obtidas de forma recombinante foi avaliada frente sua capacidade de hidrolisar esfingomielina com o auxílio do *Amplex® Red Phospholipase D Assay Kit* (Molecular Probes, Eugene, USA) que visa a detecção indireta da liberação de colina. Neste ensaio, a atividade da fosfolipase-D foi monitorada utilizando 10-acetil-3,7-di-hidroxifenoxazina (reagente *Amplex Red*), uma sonda fluorogênica sensível para  $H_2O_2$ . Para a realização do protocolo, 10 µg de cada toxina foi incubada com o substrato lipídico esfingomielina, sendo a mesma hidrolisada gerando ceramida-1-fosfato e colina. A colina por sua vez, foi oxidada pela enzima colina oxidase à betaína e  $H_2O_2$ . Finalmente, a  $H_2O_2$  na presença da peroxidase reage com o *Amplex red* estequiometricamente (1:1), gerando um produto altamente fluorescente, o resorufin. As reações foram realizadas em triplicadas, sendo as amostras incubadas em banho a 37°C por 1 hora. Em seguida, a fluorescência foi determinada em espectrofluorímetro (M200 Infinite - TECAN) usando comprimento de onda de excitação em 560 nm e emissão em 590 nm. Protocolo adaptado de Chaim e colaboradores (2011a).

### 3.5 CULTIVO CELULAR

O modelo de estudo escolhido para a realização do projeto foram células endoteliais de aorta de coelho (linhagem RAEC) (BUONASSISI, 1973), cultivadas como monocamadas e mantidas em meio F12 (mistura de nutrientes Ham's F12) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) com L-glutamina, suplementado com bicarbonato de sódio (14 mM), 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), e adição de 40 mg/L de gentamicina (Schering-Plough, Kenilworth, USA). As células foram mantidas em estufa a 37°C com uma atmosfera úmida sob tensão de 5 %  $CO_2$ . As trocas de meio foram realizadas a cada dois dias e os subcultivos realizados



quando as células atingiam a confluência de aproximadamente 90 %. Para subcultivar as células, as mesmas eram primeiramente lavadas com solução de EBSS (solução salina balanceada de Earl) sendo posteriormente, adicionado solução de pancreatina diluída em EBSS (0,25 % w/v). O complexo enzimático de pancreatina (também conhecida como viocase) é composto por collagenases, elastases, esterases, nucleases e peptidases. Este complexo é extraído do pâncreas suíno e foi adquirido da Gibco (Life Technologies Rockville, MD, EUA). As células permaneceram sob ação enzimática por um período máximo de 30 minutos. A suspensão de células foi diluída em meio F12 contendo 10 % de SFB, para inibir a ação enzimática. A seguir, as células foram coletadas por centrifugação (2500 rpm por 5 minutos) e ressuspensas novamente em meio F12 contendo 10 % de SFB. Tendo em vista o emprego de diferentes ensaios, as células foram cultivadas em garrafas e/ou placas “multiwell” provenientes da Kasvi (Curitiba, Brasil). Estoques celulares foram mantidos em nitrogênio líquido, armazenados em tubos adequados, em solução de congelamento (90 % de soro fetal bovino e 10 % de DMSO (Sigma–Aldrich)).

### 3.6 MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE

Para avaliação das alterações morfológicas e citotóxicas desencadeadas pela exposição de RAEC as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A 30.000 células foram plaqueadas em placas de 6 poços e mantidas em meio F12 suplementado com 10 % SFB por 48 horas. Após esse período as células foram lavadas 3 vezes com EBSS e então cultivadas em meio F12 sem adição do SFB (privação de nutrientes) por 16 horas. Em seguida as células foram incubadas com 50 µg/ml das diferentes toxinas dermonecróticas diluídas em meio F12 de forma isolada e observadas no tempo inicial de exposição e nos intervalos de tempo correspondentes a 1, 2, 4, 6 e 24 horas de exposição. Tais alterações foram visualizadas em microscópio de luz invertida e registradas com o auxílio de uma câmera de Sony Cyber-shot DSC- W35. Como controle negativo as células foram cultivadas somente em meio F12 isento das toxinas e como controle positivo 10 µg/ml do veneno *L. intermedia* foi diluído em meio F12. Protocolo adaptado de Chaim e colaboradores (2011a).

### 3.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade das endoteliais em resposta a exposição as toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A foi analisada através da redução do sal tetrazólico MTT (brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazólio) com o auxílio do *MTT Cell Proliferation Assay Kit* (ATCC). O anel tetrazólico do MTT, sal de coloração amarela e solúvel em água, é reduzido a formazan, cristais de coloração púrpura insolúveis em água, por células metabolicamente ativas através da ação de enzimas mitocondriais. O formazan acumula-se em células saudáveis por ser impermeável as membranas celulares e sua solubilização e quantificação por espectrofotômetro avalia a citotoxicidade da substância nas células.

Para o ensaio as células endoteliais foram plaqueadas em placas de 96 poços, em uma quantidade de 20.000 células/poço, as mesmas foram cultivadas por 24 horas em meio F12 suplementado com SFB 10 %. Após esse período foram privadas de nutrientes sendo então cultivadas por 16 horas somente em meio F12 ausente de SFB. A viabilidade foi avaliada frente a exposição das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A em concentrações de 5 µg/ml, 25 µg/ml e 50 µg/ml nos períodos de 2 e 24 horas de exposição. Foi então adicionado 20 µl de MTT uma hora antes da análise, ou seja, para o tempo de 2 horas as células foram incubadas uma hora somente com as toxinas e mais uma hora com a adição do sal, para o tempo de 24 horas as células foram incubadas por 23 horas somente com a toxina e mais uma hora com a adição do sal. O formazan acumulado em células viáveis foi dissolvido com a adição de 100 µl de DMSO. A absorbância foi obtida através da leitura em 610 nm em espectrofluorímetro (M200 Infinite - TECAN).

### 3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise da superfície celular de células endoteliais visando uma possível liberação de microvesículas frente a exposição de fosfolipases foi realizada por microscopia eletrônica de varredura. As células foram plaqueadas em lamínulas de vidro redondas com diâmetro de 13 mm alocadas em placas de 24 poços em uma quantidade de 10 000 por poço e cultivadas em meio F12 suplementado com 10 % de SFB por 48 horas. Após esse período as células foram lavadas com EBSS com o intuito de retirar todo o soro fetal bovino e então mantidas por 16 horas somente em

meio F12. Após esse período de 16 horas as células foram expostas a toxina 50 µg/ml da toxina LiRecDT1 por um período de 4 horas. Após o tempo de exposição foram novamente lavadas com EBSS com objetivo de eliminar resíduos que atrapalhariam nas imagens de microscopia e então foram fixadas em Karnovsky (paraformaldeído 2 %, glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato 0,1 M pH 7.2 a 4°C) (Karnovsky, 1965). O material foi desidratado em série alcoólica crescente e acetona, sendo o ponto crítico obtido em um Bal-Tec CPD – 030 com gás carbônico. Em seguida foi realizada a metalização em ouro obtida em um Balzers SCD – 030. As análises e a documentação do material foram feitas no microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6360 LV do Centro de Microscopia Eletrônica – Universidade Federal do Paraná.

### 3.9 EXTRATO CELULAR

O extrato celular foi realizado com o objetivo de possuir um controle para os anticorpos utilizados para a detecção de proteínas de membranas também encontradas em microvesículas de células endoteliais, além da detecção das toxinas recombinantes. Para a realização do extrato, células cultivadas em garrafas de 150 cm<sup>2</sup> foram desaderidas da superfície pela adição de solução de pancreatina diluída em EBSS (0,25 % massa/volume), como descrito no item 3.5 de Materiais e Métodos. Após, a suspensão de células foi diluída em meio F12 contendo 10 % de SFB, para inibir a ação enzimática e então coletadas por centrifugação (1500 rpm por 5 minutos) onde o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular utilizado para o extrato. O precipitado celular foi ressuspenso em tampão de lise TNE (NaCl 150 mM, Tris-HCl 25 mM pH 7.5, EDTA 5 mM e Triton X-100 1 % acrescido de iodoacetamida 10 mM, 1,10-fenantrolina 10 mM, e benzamidina 10 mM) e submetido a sonicação (10 ciclos de 10 segundos a 50 % de potência). Posteriormente o extrato celular foi analisado por eletroforese em gel gradiente de poliacrilamida SDS-PAGE (7,5 - 18 %) sob condições redutoras seguido de *immunoblotting*.

### 3.10 ISOLAMENTO DE MICROVESÍCULAS A PARTIR DE CÉLULAS ENDOTELIAIS CULTIVADAS

Com o objetivo de isolar as possíveis microvesículas liberadas pelas células da linhagem RAEC frente a exposição das toxinas recombinantes, estas foram

cultivadas em garrafas de 150 cm<sup>2</sup> e, quando confluentes, expostas a 50 µg/ml das toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A diluídas em 10 ml de meio F12 por um período de 4 e 24 horas. Após o tempo de exposição, o meio em que foram cultivadas e expostas a toxinas foi submetido a uma série de centrifugações. Primeiro, o sobrenadante foi centrifugado a 1500 xg por 10 minutos seguido de outras duas centrifugações de 3000 xg por 15 minutos para remoção de células intactas, detritos celulares e corpos apoptóticos. Subsequentemente, os sobrenadantes recolhidos foram transferidos para tubos novos de ultracentrifugação e então centrifugados a 200000 xg por 2 horas a 4°C (Beckman Coulter, Swinging Bucket rotor SW41 Ti) com o objetivo sedimentar as possíveis microvesículas. As microvesículas sedimentadas foram ressuspensas 100 µl em tampão PBS para análise em gel gradiente de poliacrilamida SDS-PAGE (7,5 - 18 %) sob condições desnaturantes e *immunoblotting*. Protocolo adaptado de Brodsky e colaboradores (2003).

### 3.11 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS DO MEIO DE CULTIVO DE CÉLULAS EXPOSTAS AS TOXINAS COM ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (TCA)

As células foram cultivadas e expostas as toxinas como descrito no item 3.10 de Materiais e Métodos. O conteúdo proteico do sobrenadante em que as células foram cultivadas foi precipitado pela adição de 2,5 ml de ácido tricloroacético 50 % em 10 ml de amostra e incubados por 30 minutos a 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20000 xg por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e então lavado com 10 ml de água mili-Q seguida de outra centrifugação a 20000 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os precipitados resultantes ressuspensos em tampão PBS e analisados em gel gradiente de poliacrilamida SDS-PAGE (7,5 – 18 %) sob condições redutoras e *immunoblotting*.

### 3.12 SDS-PAGE

A análise da expressão das toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A foi realizada através da eletroforese em géis de poliacrilamida 12,5 % contendo detergente aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) sob condições redutoras (contendo 5 % de β-mercaptoetanol). Da mesma forma, os precipitados resultantes da ultracentrifugação do protocolo de isolamento de microvesículas, assim como os

precipitados obtidos pela precipitação com TCA e os extratos celulares foram avaliadas por SDS-PAGE sob condições redutoras em gel de poliacrilamida gradiente 7,5 - 18 %.

A solução de poliacrilamida contendo os catalisadores APS e TEMED foi colocada entre placas de vidro e isolada com uma camada de isobutanol. Após a polimerização, foi removida a camada de água e isobutanol acima do gel com auxílio de papel filtro. A solução de empacotamento, contendo 5 % de poliacrilamida e os catalisadores, foi colocada acima do gel e nela foi posicionado o suporte para formação dos poços. Após a polimerização, o suporte foi removido e os poços secos com auxílio de papel filtro. A separação das proteínas foi obtida mediante aplicação de corrente de 25 mA constante, até a separação total das mesmas.

Os géis foram corados com solução contendo Azul de Coomassie Brilhante R-250 0,25 % (Amresco), metanol 50 % e ácido acético 10 % em água deionizada, por 10 minutos à temperatura ambiente sob agitação constante. A descoloração foi realizada com metanol 50 % em água deionizada, com sucessivas trocas da solução de metanol. Em seguida, os géis foram observados sob luz branca e foto documentados em *scanner* HP Deskjet F4180.

### 3.13 IMMUNOBLOTTING

Visando a identificação dos marcadores de membrana de células da linhagem RAEC e microvesículas derivadas das mesmas, as amostras foram avaliadas por *Western Blotting* e *Dot Blotting*. O extrato celular e as amostras provenientes da precipitação com TCA e do isolamento de microvesículas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida como descrito no item 3.12 de Materiais e Métodos. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (GE) por 30 minutos sob tensão de 25 V. Em seguida as membranas foram bloqueadas por 2 horas com caseína 5 % diluída em tampão TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,01 %) e então incubadas por 16 horas a 4°C com os anticorpos primários: anti-caveolina-1 (1:1000) (Cusabio) por esta ser uma molécula abundante na membrana de células endoteliais, e por haver um protocolo já estabelecido no laboratório onde a caveolina é identificada em extratos celulares; anti-VE-caderina (1:500) (Santa Cruz) e anti-E-selectina (1:500) (Santa Cruz), buscando identificar proteínas de membranas no extrato celular e no sobrenadante como marcadores de microvesículas. Após o

tempo de incubação foram realizadas 3 lavagens com tampão TBS-T e então as membranas foram incubadas com anticorpos secundários por 1h: anti-*rabbit* conjugado com peroxidase ou fosfatase alcalina para a identificação da caveolina; anti-*mouse* conjugado com peroxidase ou fosfatase alcalina para a identificação da VE-caderina; e anti-*goat* conjugado com fosfatase alcalina para a identificação da E-selectina. As membranas que continham o anticorpo secundário conjugado a peroxidase foram reveladas com o substrato para quimioluminescência *Super Signal West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo-Scientific) e visualizadas com o auxílio do equipamento AmershamImager 600 (GE Healthcare), enquanto as membranas que foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados a fosfatase alcalina foram reveladas com o substrato BCIP e o cromógeno NBT (Promega) em tampão ótimo para atividade da fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM e MgCl<sub>2</sub> 5 mM). Protocolo adaptado de Harlow e Lane (1988).

A técnica de *Dot Blotting* foi realizada com o objetivo de identificar epítomos conformacionais das proteínas citadas anteriormente. Para isto, as amostras diluídas em PBS foram concentradas em uma única gota sobre a membrana de nitrocelulose, as membranas foram então bloqueadas, incubadas com os anticorpos primários e secundários e reveladas como descrito acima para técnica de *Western Blotting*.

### 3.14 DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Azul de Coomassie, adaptado para leitura em leitor de placas de 96 poços. O método baseia-se na diferença de coloração em que o Azul de Coomassie pode se encontrar. Ao ligar-se a proteínas, o reativo passa da coloração vermelha para azul, sendo sua absorbância determinada em 595 nm. A curva padrão foi construída com diferentes quantidades (0,25 µg – 2,00 µg) de Albumina de Soro Bovino (BSA) e as amostras foram diluídas para entrarem na região de linearidade da curva. O volume total de cada ponto da curva e das amostras foi de 20 µL. O reativo para dosagem de proteínas *Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad) foi diluído adicionando uma parte do reativo em 4 partes de água. Foram adicionados 200 µL do reativo diluído em cada ponto da curva e nas amostras, e após 5 minutos de incubação foi determinada a absorbância em 595 nm. Os pontos da curva e as amostras foram lidos em duplicatas, sendo que o coeficiente

de determinação aceitável da curva de BSA foi  $R^2 > 0,99$ . Protocolo adaptado de Bradford (1976).

### 3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados de viabilidade foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) e do teste de Tukey com o auxílio do programa GraphPad Prism 7. Os resultados foram representados pela média  $\pm$  erro padrão da média e a significância foi determinada como  $P \leq 0.0012$ .

## 4.1 RESULTADOS

### 4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS TOXINAS LiRecDT1 E LiRecDT1 H12A

A partir de construções já existentes referentes as duas isoformas de fosfolipases-D, previamente obtidas a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de *L. intermedia*, as proteínas recombinantes foram expressas com cauda de 6 histidinas e purificadas a partir da fração solúvel do lisado celular por cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA Agarose resultando em aproximadamente 30 mg/L de cultura para a LiRecDT1 (DT1) e 20 mg/L para a LiRecDT1 H12A (H12A).

A massa molecular e pureza das proteínas recombinantes foram analisadas por SDS-PAGE 12,5 % sob condições redutoras, no qual foram aplicadas amostras referentes ao tempo 0h, antes da adição de IPTG a cultura, amostras do tempo de 3,5h, tempo final da indução da expressão pela adição de IPTG, amostras do *void*, contendo proteínas que não ligaram a resina Ni-NTA Agarose, e amostra das proteínas já purificadas. Em relação a expressão fica nítida a presença de uma banda de maior intensidade encontrada no tempo de 3,5 horas em comparação ao tempo inicial de expressão, tais bandas representam a LiRecDT1 (FIGURA 5), LiRecDT1 H12A (FIGURA 6) com massa molecular de aproximadamente 35kDa, mobilidade eletroforética esperada para as fosfolipases. É possível visualizar também que a ligação à resina de níquel foi satisfatória, pois não foi observada uma banda considerável referente a proteína no *void*, da mesma forma que a técnica de purificação se mostrou eficiente pois não é possível verificar outras bandas, sugerindo contaminação, na amostra das toxinas purificadas. E ainda por se tratar da análise da fração solúvel obtida após a lise das células constatamos que as mesmas foram expressas em suas formas solúveis. Esses resultados corroboram com os dados presentes na literatura (CHAIM *et al.*, 2011a; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; MAGALHÃES *et al.*, 2013).



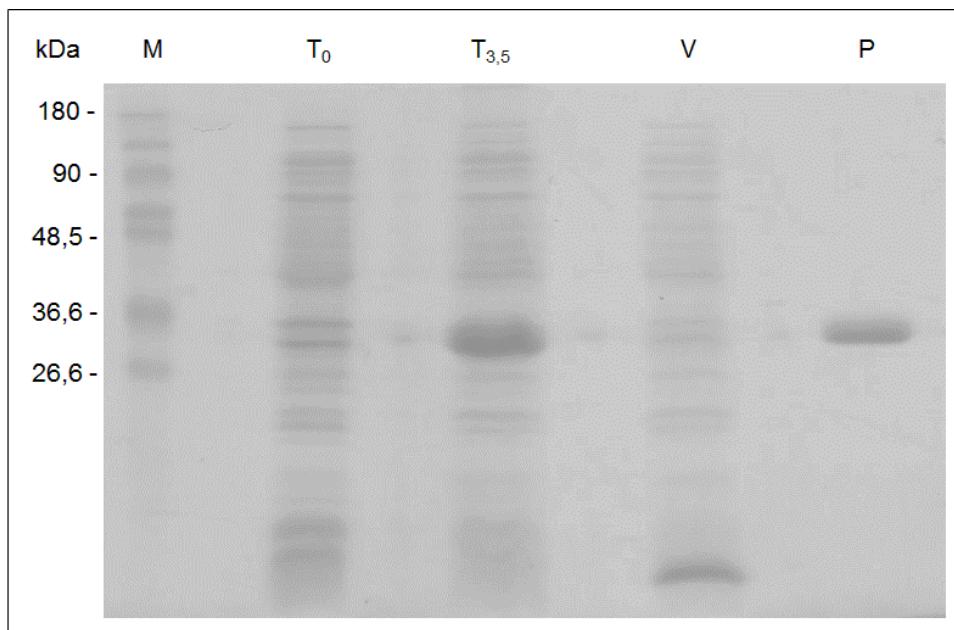


FIGURA 5 - ANÁLISE POR SDS-PAGE 12,5 % SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA TOXINA LiRecDT1. Expressão realizada pela adição de 0,05 mM de IPTG em meio LB líquido a 30°C utilizando a cepa de expressão *E. Coli* BL21 (DE3) pLysS. O marcador de massa molecular está representado por "M"; "T<sub>0</sub>" indica o tempo inicial da expressão em horas; "T<sub>3,5</sub>" indica o tempo final da expressão em horas onde é possível verificar um aumento na intensidade da banda em aproximadamente 35 kDa quando comparado "T<sub>0</sub>" referente a LiRecDT1; "V" corresponde ao *void* da cromatografia após incubação do lisado com resina Ni-NTA Agarose; "P" proteína purificada após cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA Agarose.

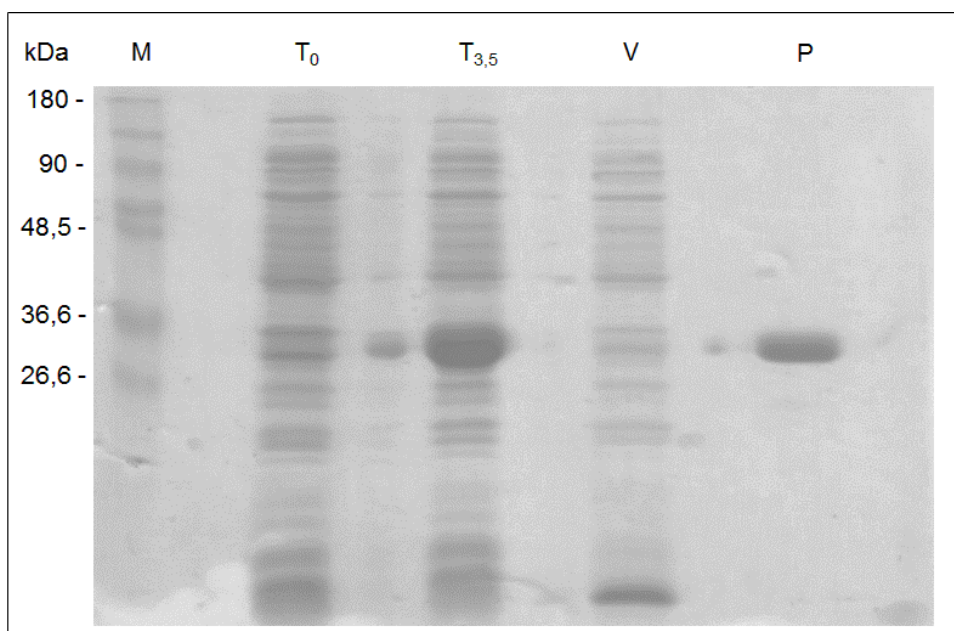


FIGURA 6 - ANÁLISE POR SDS-PAGE 12,5 % SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA TOXINA LiRecDT1 H12A. Expressão realizada pela adição de 0,05 mM de IPTG em meio LB líquido a 30°C utilizando a cepa de expressão *E. Coli* BL21 (DE3) pLysS. O marcador de massa molecular esta representado por "M"; "T<sub>0</sub>" indica o tempo inicial da expressão em horas; "T<sub>3,5</sub>" indica o tempo final da expressão em horas onde é possível verificar um aumento na intensidade da banda em aproximadamente 35 kDa quando comparado "T<sub>0</sub>" referente a LiRecDT1 H12A; "V" corresponde ao *void* da cromatografia após incubação do lisado com resina Ni-NTA Agarose; "P" proteína purificada após cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA Agarose.

## 4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LiRecDT1 E LiRecDT1 H12A *IN VITRO*

Após expressão e purificação as toxinas foram avaliadas frente a sua atividade catalítica por ensaio fluorimétrico utilizando esfingomielinina como substrato. Após o ensaio, os dados obtidos demonstraram que a isoforma LiRecDT1 possui alta atividade esfingomielinásica em comparação ao controle negativo com PBS, enquanto a isoforma mutada possui apenas atividade residual (FIGURA 7). Estes dados corroboram os resultados obtidos por Chaim e colaboradores (2011a) e permitem a utilização da LiRecDT1 como enzimas dermonecróticas ativas, e da LiRecDT1 H12A como a enzima dermonecrótica com atividade residual para ensaios *in vitro*.

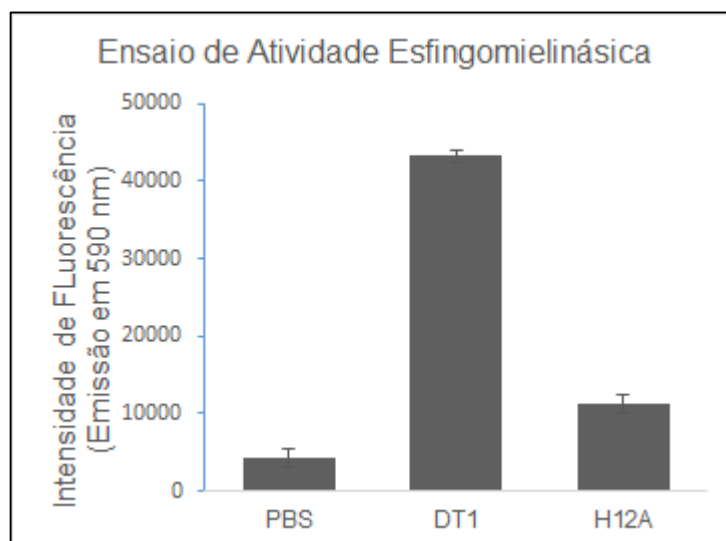


FIGURA 7 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA DA LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A. A atividade esfingomielinásica das toxinas recombinantes foram avaliadas utilizando o kit para detecção indireta da liberação de colina, *Amplex Red*. Os ensaios aconteceram a 37°C por 1 hora. O produto da reação foi determinado por espectrofluorimetria com excitação em 560nm e emissão em 590nm. Como controle de reação foi utilizado PBS na ausência de qualquer toxina. As reações foram realizadas em triplicatas com 10 µg das toxinas recombinantes. Os valores dados são a média ± desvio padrão.

## 4.3 EFEITO DA LiRecDT1 E LiRecDT1 H12A NA MORFOLOGIA E VIABILIDADE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS

Para determinar a citotoxicidade direta de LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A em células endoteliais foram realizados experimentos buscando alterações morfológicas e mudanças na viabilidade, por ensaio de MTT, de células endoteliais expostas as toxinas.

Células endoteliais de aorta de coelho foram avaliadas quanto sua morfologia após serem expostas às toxinas purificadas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A (50 µg/ml de meio de cultura para ambas as isoformas) e veneno de *L. intermedia* (10 µg/ml de meio de cultura). Como controle foram utilizadas células cultivadas em meio F12 sem a presença das toxinas. As mesmas foram observadas no tempo inicial de exposição e nos intervalos de 1, 2, 4, 6 e 24 horas por microscópio de contraste de fase invertido.

No tempo inicial, as células expostas as toxinas recombinantes e ao veneno possuíam morfologia semelhante ao grupo controle (FIGURA 8).

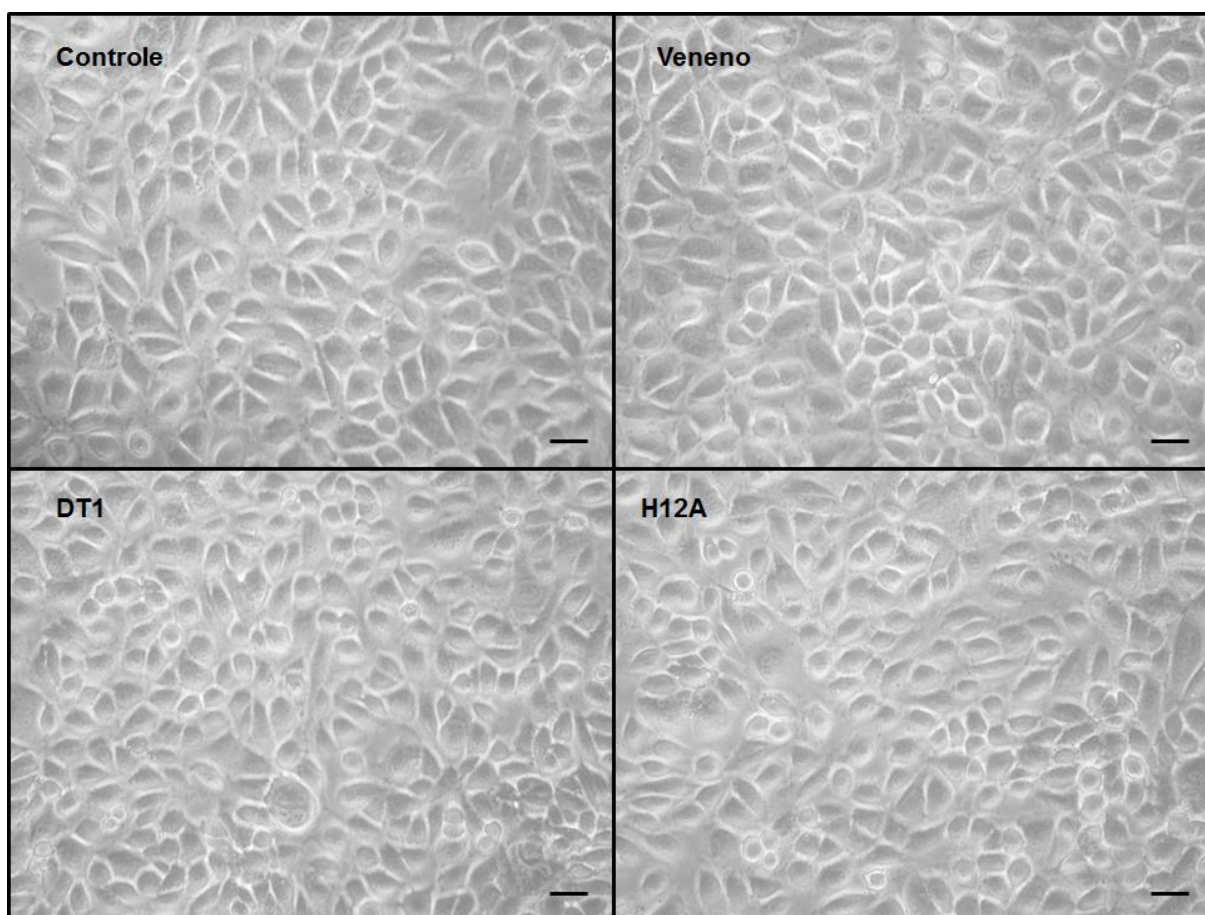


FIGURA 8 – AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LiRecDT1 E VENENO DE *L. intermedia* EM CÉLULAS RAEC NO TEMPO INICIAL DE EXPOSIÇÃO. Células da linhagem RAEC mantidas em meio F12 (controle) e expostas ao veneno de *L. intermedia* e as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A foram observadas por microscopia de contraste de fase logo após a incubação. Não é possível verificar diferenças entre as células expostas às toxinas em comparação as células do grupo controle. As barras representam 50µm. Aumento de 520x.

Após uma hora de exposição é possível verificar que algumas células expostas a LiRecDT1 apresentaram vacúolos citoplasmáticos (FIGURA 9 - DT1), caracterizando sinais de citotoxicidade, enquanto a LiRecDT1 H12A não parece induzir alteração significativa nas células. Já as células expostas ao veneno

apresentaram morfologia arredondada, evidenciando o início da desadesão à matriz extracelular (FIGURA 9 - Veneno), corroborando dados obtidos por Veiga e colaboradores (2000b). Resultados semelhantes aos de 1 hora foram observadas no intervalo de tempo de 2 horas (FIGURA 10).

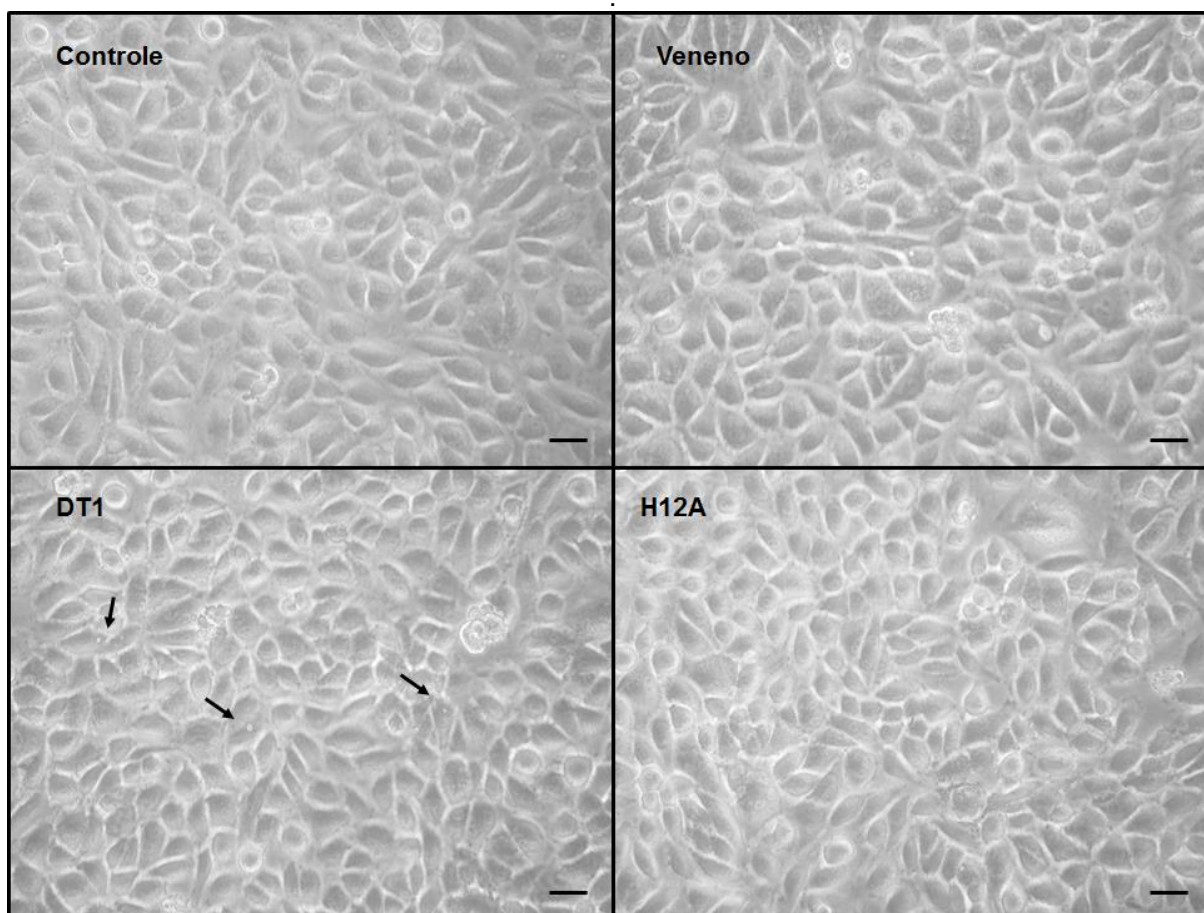


FIGURA 9 – AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LiRecDT1 E VENENO DE *L. intermedia* EM CÉLULAS RAEC APÓS UMA HORA DE EXPOSIÇÃO. Células da linhagem RAEC mantidas em meio F12 (controle) e expostas ao veneno de *L. intermedia* e as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A foram observadas por microscopia de contraste de fase após uma hora de incubação. As células expostas ao veneno de *L. intermedia* apresentaram morfologia arredondada indicando desadesão da matriz extracelular. Já as células expostas à LiRecDT1 apresentaram alguns vacúolos citoplasmáticos (setas) enquanto as células expostas a LiRecDT1 H12A não apresentaram diferenças morfológicas quando comparadas ao do grupo controle. As barras representam 50µm. Aumento de 520x.



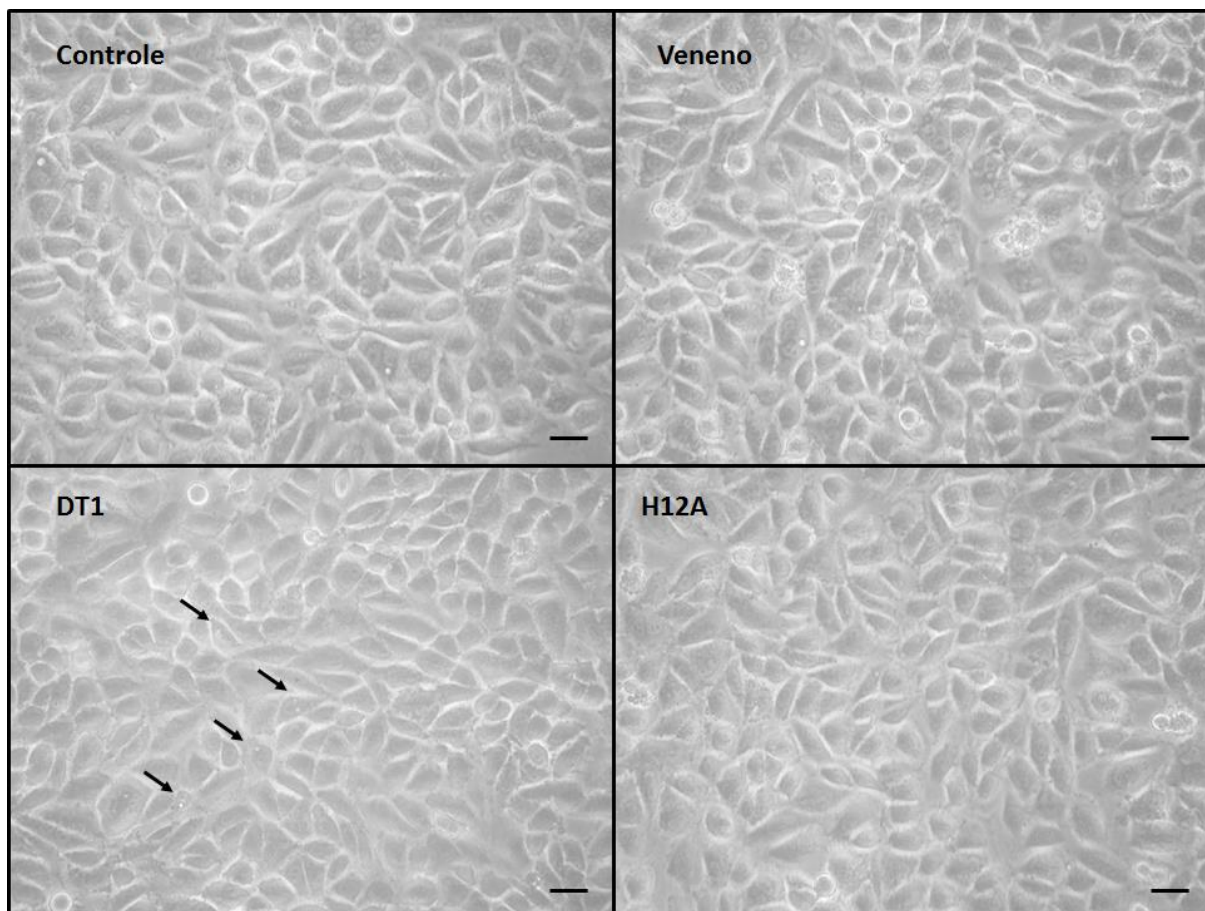


FIGURA 10 – AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LiRecDT1 E VENENO DE *L. intermedia* EM CÉLULAS RAEC APÓS DUAS HORAS DE EXPOSIÇÃO. Células da linhagem RAEC mantidas em meio F12 (controle) e expostas ao veneno de *L. intermedia* e as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A foram observadas por microscopia de contraste de fase após duas horas de incubação. As células expostas ao veneno de *L. intermedia* apresentaram morfologia arredondada indicando desadesão da matriz extracelular. Já as células expostas à LiRecDT1 apresentaram alguns vacúolos citoplasmáticos (setas) enquanto as células expostas a LiRecDT1 H12A não apresentaram diferenças morfológicas quando comparadas ao do grupo controle. As barras representam 50µm. Aumento de 520x.

Nos intervalos seguintes de 4 horas (FIGURA 11) e 6 horas (FIGURA 12) verificamos desadesão de células expostas ao veneno (FIGURA 11 – Veneno e FIGURA 12 – Veneno) e ainda é possível verificar que a quantidade de vacúolos citoplasmáticos nas células exposta a LiRecDT1 tende aumentar.

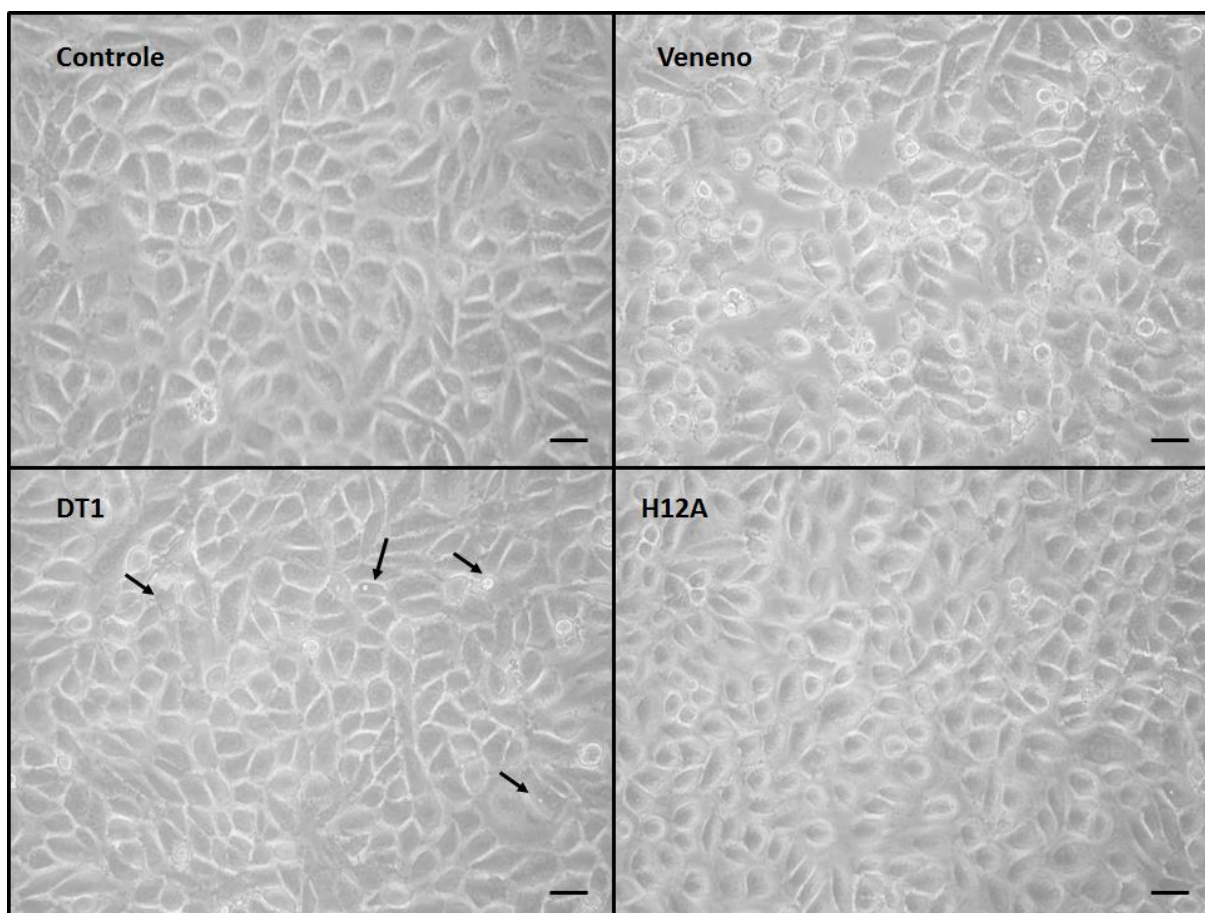


FIGURA 11 – AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LiRecDT1 E VENENO DE *L. intermedia* EM CÉLULAS RAEC APÓS QUATRO HORAS DE EXPOSIÇÃO. Células da linhagem RAEC mantidas em meio F12 (controle) e expostas ao veneno de *L. intermedia* e as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A foram observadas por microscopia de contraste de fase após quatro horas de incubação. As células expostas ao veneno de *L. intermedia* apresentaram morfologia arredondada indicando desadesão da matriz extracelular. Já as células expostas à LiRecDT1 apresentaram alguns vacúolos citoplasmáticos (setas) enquanto as células expostas a LiRecDT1 H12A não apresentaram diferença morfológica quando comparadas ao do grupo controle. As barras representam 50µm. Aumento de 520x.

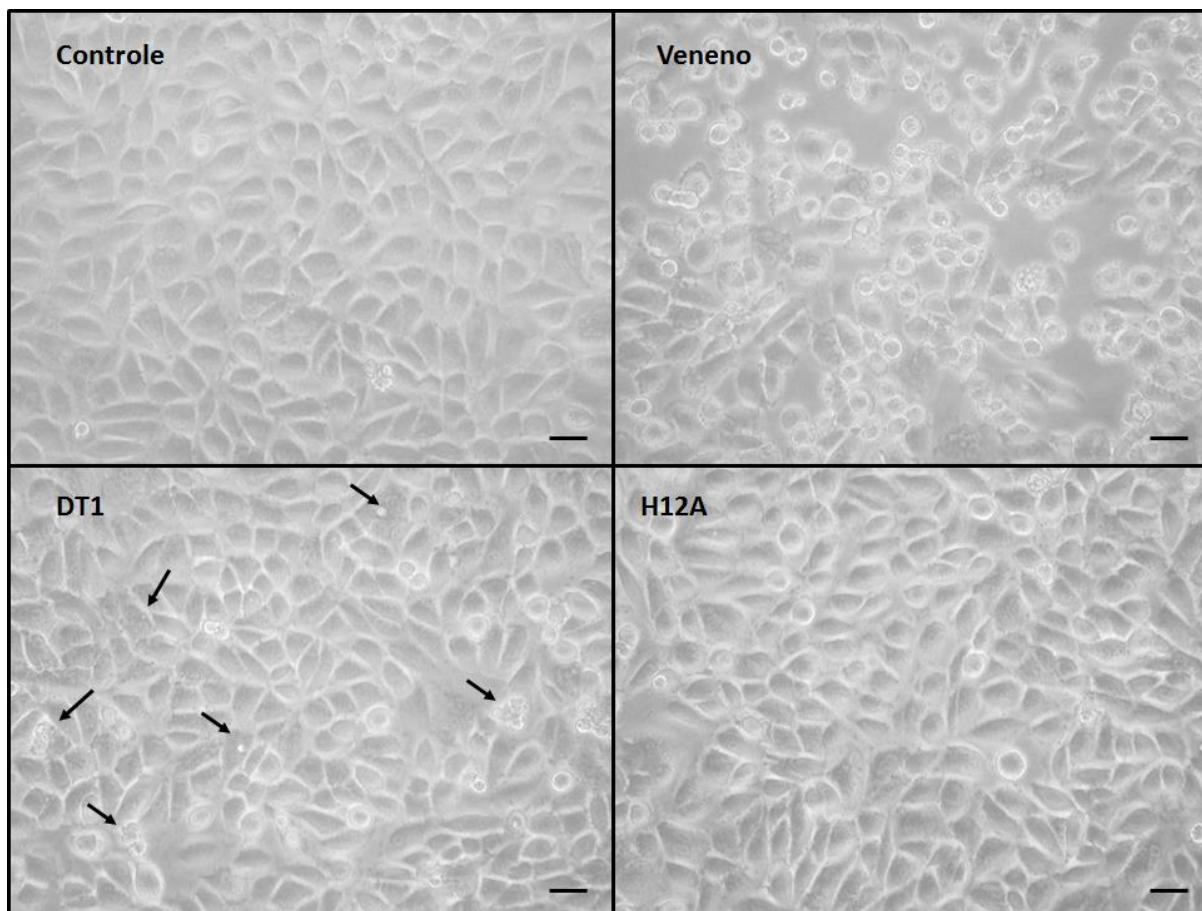


FIGURA 12 – AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LiRecDT1 E VENENO DE *L. intermedia* EM CÉLULAS RAEC APÓS SEIS HORAS DE EXPOSIÇÃO. Células da linhagem RAEC mantidas em meio F12 (controle) e expostas ao veneno de *L. intermedia* e as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A foram observadas por microscopia de contraste de fase após seis horas de incubação. As células expostas ao veneno de *L. intermedia* apresentaram morfologia arredondada indicando desadesão da matriz extracelular. Já as células expostas à LiRecDT1 apresentaram alguns vacúolos citoplasmáticos (setas) enquanto as células expostas a LiRecDT1 H12A não apresentaram diferença morfológica quando comparadas ao do grupo controle. As barras representam 50µm. Aumento de 520x.

Após 24 horas, as células expostas ao veneno se apresentaram desaderidas da matriz extracelular (FIGURA 13 - Veneno). Seguindo um padrão, as células expostas à LiRecDT1 continuaram a apresentar vacuolização citoplasmática (FIGURA 13 – DT1), porém é possível observar também que algumas células expostas à LiRecDT1 H12A passam a apresentar também vacúolos citoplasmático, evidenciando um efeito citotóxico tardio (FIGURA 13 – H12A).



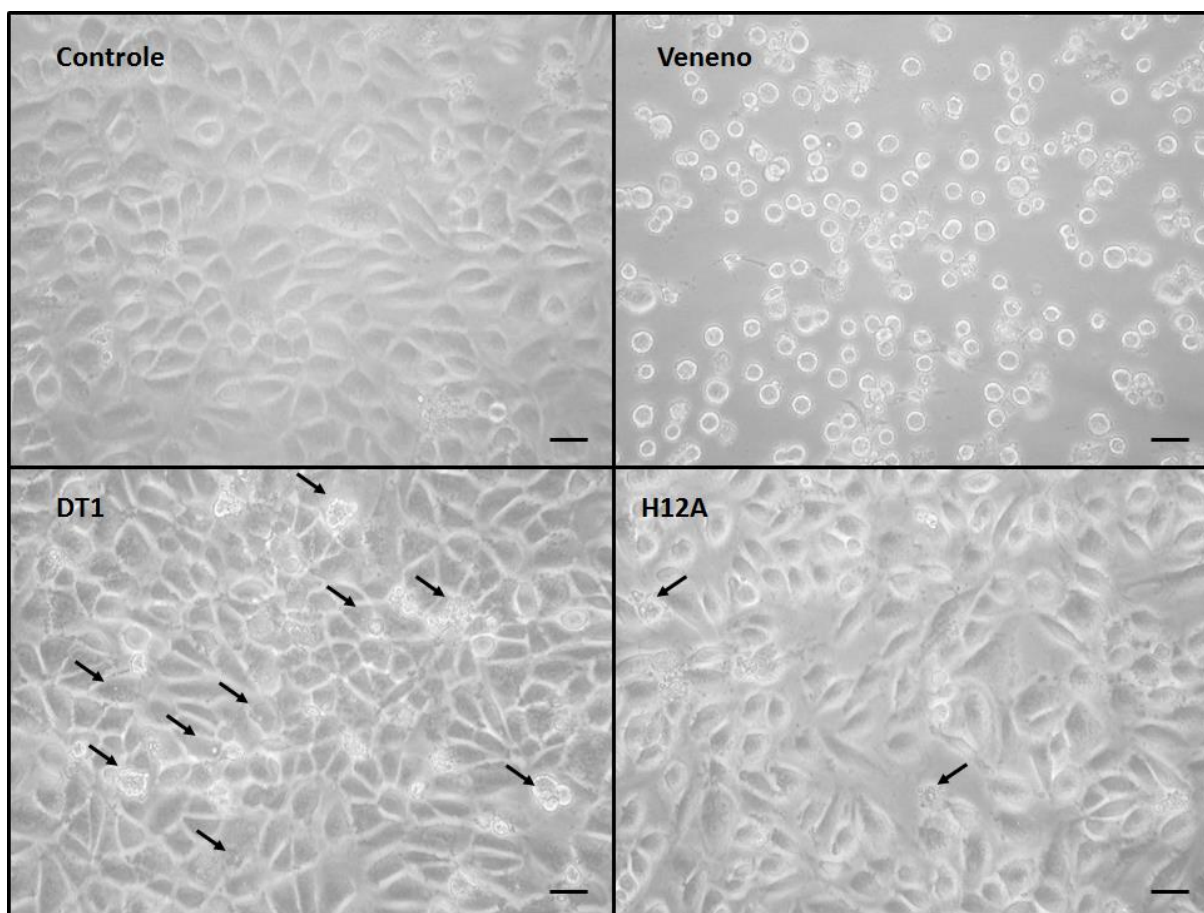


FIGURA 13 – AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LiRecDT1 E VENENO DE *L. intermedia* EM CÉLULAS RAEC APÓS VINTE E QUATRO HORAS DE EXPOSIÇÃO. Células da linhagem RAEC mantidas em meio F12 (controle) e expostas ao veneno de *L. intermedia* e as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A foram observadas por microscopia de contraste de fase após vinte e quatro horas de incubação. As células expostas ao veneno de *L. intermedia* apresentaram morfologia arredondada indicando desadesão da matriz extracelular. Já as células expostas à LiRecDT1 apresentaram alguns vacúolos citoplasmáticos (setas). Células expostas a LiRecDT1 H12A passam a apresentar vacúolos citoplasmáticos neste intervalo de tempo. As barras representam 50µm. Aumento de 520x.

Conforme ilustrado na FIGURA 14, o ensaio de viabilidade celular por MTT indicou alteração significativa na viabilidade de células endoteliais expostas as fosfolipase-D quando comparadas com as células do controle. Este dado reforça a ideia de citotoxicidade da toxina dermonecrótica sobre células endoteliais.

As células expostas LiRecDT1 possuíram uma produção de formazan diminuída quando comparadas ao grupo controle e a perda de viabilidade foi maior quando submetidas a concentrações maiores da toxina bem como entre os intervalos de tempo de 2 e 24 horas. Já as células expostas a LiRecDT1 H12A não apresentaram uma perda de viabilidade significante no tempo de 2 horas quando comparadas ao controle independente da concentração, porém no tempo de 24 horas podemos



observar perda de viabilidade significativa das células expostas a toxina mutada quando comparadas ao controle.

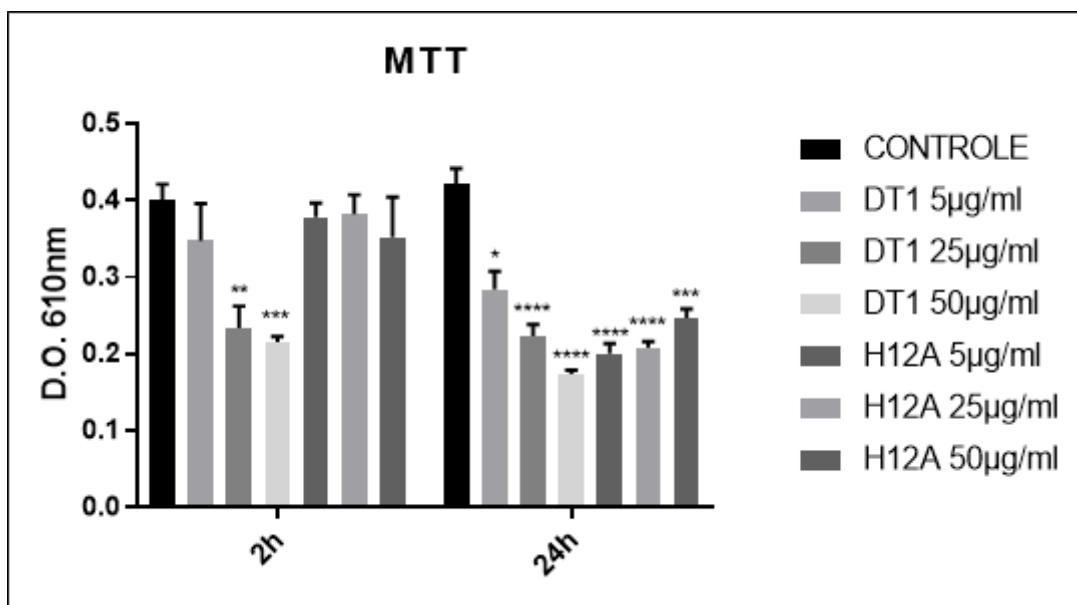


FIGURA 14 - EFEITO CITOTÓXICO DE LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A EM CÉLULAS ENDOTELIAIS ANALISADAS PELA PRODUÇÃO DE FORMAZAN (ENSAIO DE MTT). O efeito citotóxico tanto da LiRecDT1 quanto da LiRecDT1 H12A foi determinado após 2 e 24 horas nas concentrações das toxinas indicadas no gráfico. Os experimentos foram realizados em quintuplicatas, e os valores apresentados no gráfico correspondem a média  $\pm$  erro padrão da média. A significância é definida como \*\* P = 0.0012 e \*\*\* P < 0.0001

#### 4.4 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE RAEC

Células endoteliais expostas a LiRecDT1 foram analisadas por imagens de microscopia eletrônica de varredura com o objetivo de verificar alterações na membrana celular devido a exposição a toxina. Embora a qualidade das imagens não tenham ficados ideais a ponto de sugerir vesiculações claras é possível perceber que células utilizadas como controle possuem uma imagem mais limpa do que as comparadas com o grupo exposto a LiRecDT1, possui uma maior quantidade de fragmentos (FIGURA 15).

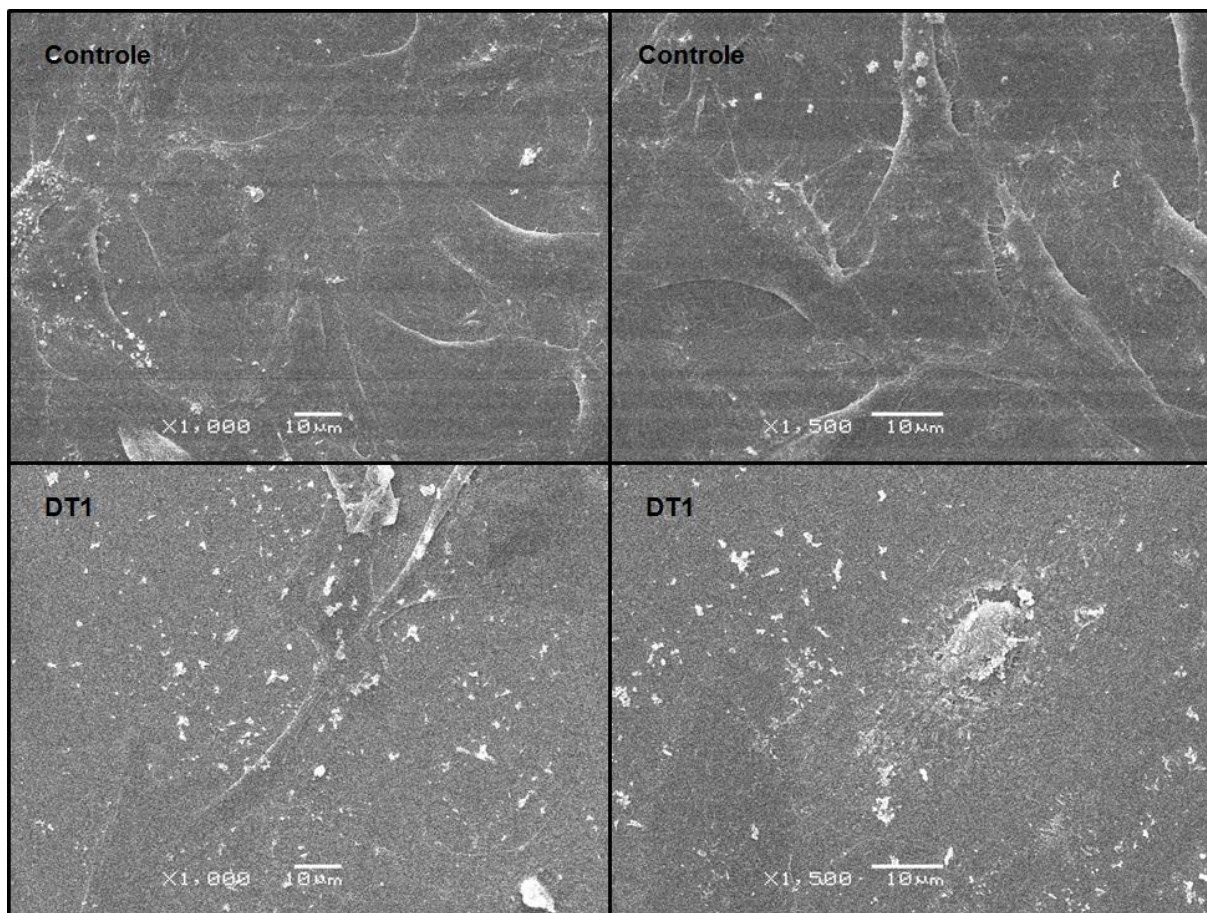


FIGURA 15 - ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL DE CÉLULAS RAEC EXPOSTAS A LiRecDT1. Análise por microscopia eletrônica de varredura de células RAEC. As análises foram realizadas em células controle e em células expostas a LiRecDT1 (50 µg/ml) por 4 horas. As barras representam 10 µm. Aumento de 1.000x e 1.500x.

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES DE MEMBRANAS EM EXTRATO CELULAR E EM CONTEÚDOS PROTEICOS LIBERADOS PARA O MEIO DE CULTIVO POR CELULAS ENDOTELIAIS EXPOSTAS A LiRecDT1

Na FIGURA 16 – A foram analisadas amostras referentes ao extrato celular de células utilizadas como controle e expostas a DT1 por períodos de 4 e 24 horas. Nesta mesma imagem foram também analisadas amostras da precipitação com TCA do conteúdo proteico do meio de cultivo de células utilizadas como controles e expostas a toxina DT1 por 4 e 24 horas.

Na FIGURA 16 – B, foram realizados dois protocolos para observação do conteúdo proteico presente no meio após a eliminação de células intactas, *debris* celulares e corpos apoptóticos por centrifugação de baixa rotação, 1) sedimento obtido após ultracentrifugação (aplicação do protocolo de isolamento de microvesículas) 2)

precipitação de proteínas pela adição de TCA. Todas as amostras foram analisados por SDS-PAGE em um gradiente de 7,5 - 18 % sob condições redutoras.

Ao comparar o perfil proteico dos conteúdo liberados para o meio é possível verificar um padrão de bandas diferentes entre a sedimentação por ultracentrifugação e as duas maneiras utilizadas de precipitação. As precipitações do conteúdo presente no meio, sem a aplicação de centrifugações de baixa rotação, apresentam uma maior quantidade de bandas quando comparadas as outras duas análises (sedimento da ultracentrifugação e precipitação com TCA após aplicação de centrifugações de baixa rotação), provavelmente devido a presença de *debris* celulares, corpos apoptóticos e células intactas presentes no sobrenadante que não foram removidas por não ser aplicado os passos iniciais de centrifugação. Já ao comparar a coluna correspondente ao sedimento da ultracentrifugação e o conteúdo precipitado com TCA (FIGURA 16 – B), verificamos que o TCA foi capaz de precipitar outros conteúdos que não foram sedimentados pela ultracentrifugação. Em todas as colunas correspondes aos grupos tratados fica evidente uma banda de maior intensidade de altura de aproximadamente 35 kDa, provavelmente correspondente a DT1 encontrada no meio. Ainda verificamos uma banda na altura de aproximadamente 50 kDa que se torna mais evidentes nos grupos precipitados com TCA do que no sedimento das ultracentrifugações.

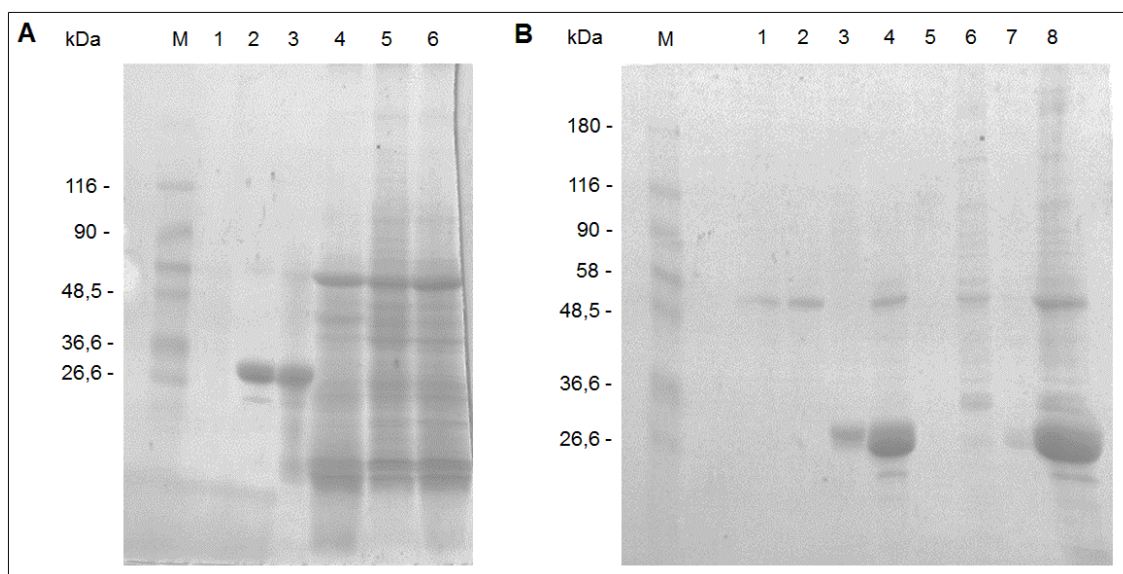


FIGURA 16 – EXTRATO CELULAR E CONTEÚDO PROTEICO LIBERADO PARA O MEIO DE CULTURA POR CÉLULAS ENDOTELIAIS EXPOSTAS A LiRecDT1. (A) Amostras “1”, “2” e “3” correspondem a precipitação por TCA do conteúdo proteico liberado para o meio de cultura por células RAEC utilizadas como controle e expostas a DT1 por 4 e 24 horas, respectivamente. Colunas “4”, “5” e “6” correspondem ao extrato celular obtido de células RAEC utilizadas como controle e expostas a DT1 por 4 e 24 horas, respectivamente (B) As amostras “1”, “3” “5” e “7” correspondem ao sedimento obtido após a ultracentrifugação, protocolo aplicado para isolamento de microvesículas, em células utilizadas como controle para 4 horas, células expostas a DT1 por 4 horas, células utilizadas como controle para 24 horas e células expostas a DT1 por 24 horas, respectivamente. Amostras “2”, “4”, “6” e “8” correspondem ao precipitado obtido pela adição de TCA em meio de cultivo livre de *debris* celulares, células intactas e corpos apoptóticos (aplicação de centrifugação de baixa rotação) em células utilizadas como controle para 4 horas, células expostas a DT1 por 4 horas, células utilizadas como controle para 24 horas e células expostas a DT1 por 24 horas, respectivamente.

As proteínas visualizadas por SDS-Page foram transferidas para membranas de nitrocelulose onde buscamos identificar marcadores de membrana como caveolina, VE-caderina e E-selectina em extratos celulares além de buscar identificar VE-caderina e E-selectina em amostras precipitadas por TCA e em sedimentos resultantes da ultracentrifugação, como citado no resultado anterior (FIGURA 16 - B). Como ilustrado na FIGURA 17 foi possível identificar somente uma banda de baixa intensidade correspondente a caveolina no extrato celular de células RAEC. Nenhuma banda referente as proteínas de membrana VE-caderina e E-selectina foram encontradas em amostras de extrato e em amostra que buscavam analisar conteúdo proteico no meio celular. O extrato celular nesse caso foi utilizado como controle para a detecção das proteínas de membranas presentes em células de linhagem endotelial.

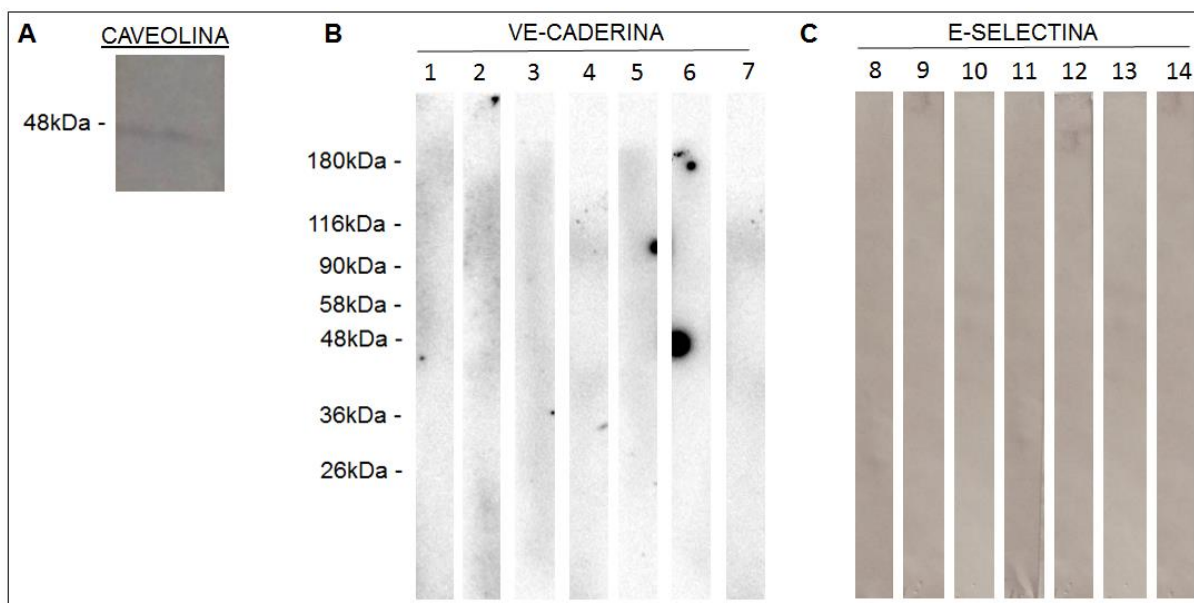


FIGURA 17 – IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES DE MEMBRANA EM EXTRATO CELULAR DE RAEC E EM CONTEÚDOS LIBERADOS PARA O MEIO APÓS A EXPOSIÇÃO DE CELULAS ENDOTELIAIS A LiRecDT1. (A) Identificação de caveolina no extrato proteico de RAEC, com massa molecular de aproximadamente 48 kDa. (B) identificação de VE-caderina em extrato celular “1”. Identificação de VE-caderina no sedimento obtido por ultracentrifugação (protocolo para isolamento de microvesículas) aplicado no meio de cultivo de células controle e expostas a DT1 por 4 e 24 horas, amostras “2”, “4” e “6” respectivamente. Identificação de VE-caderina em conteúdos proteicos liberados para o meio de cultivo precipitado com TCA para células controle e expostas a DT1 por 4 e 24 horas, amostras “3”, “5” e “7” respectivamente. (C) identificação de E-selectina em extrato celular “8”. Identificação de E-selectina no sedimento obtido por ultracentrifugação (protocolo para isolamento de microvesículas) aplicado no meio de cultivo de células controle e expostas a DT1 por 4 e 24 horas, amostras “9”, “11” e “13” respectivamente. Identificação de E-selectina em conteúdos proteicos liberados para o meio de cultivo precipitado com TCA para células controle e expostas a DT1 por 4 e 24 horas, amostras “10”, “12” e “14” respectivamente.

Tendo em vista o resultado anterior apresentado na FIGURA 17 foi realizado *dot blotting* com o extrato celular buscando identificar epítomos conformacionais das proteínas de interesse. Os resultados estão mostrado na FIGURA 18, onde extratos celulares incubados com anticorpos para a detecção de VE-caderina, E-selectina e caveolina apresentaram marcação sugerindo que os anticorpos haviam detectado as proteínas de interesse, porém ao realizar o controle do anticorpo secundário, onde as mesmas amostra foram incubadas somente com anti-*mouse*, anti-*goat* e anti-*rabbit* (anticorpos utilizados para a revelação dos *dots blotting* anteriores), sem serem previamente incubados com os anticorpos primários, foi possível verificar que os mesmos interagiram com o conteúdo do extrato celular, mostrando que a marcação não era específica.



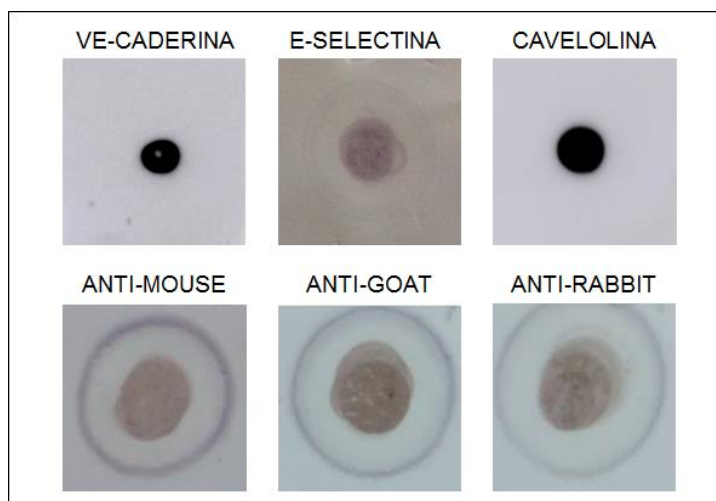


FIGURA 18 – *DOT BLOT* SOBRE EXTRATO CELULAR BUSCANDO PROTEÍNAS DE MEMBRANAS EM RAEC E CONTROLE DOS ANTICORPOS SECUNDÁRIOS. Extrato celular de RAEC incubados com anticorpos para detecção de VE-caderina, E-selectina e caveolina e incubados somente com os anticorpos secundários *anti-mouse*, *anti-goat* e *anti-rabbit* respectivamente.

Da mesma forma foram realizados *dot blotting* com o conteúdo obtido por sedimentação após ultracentrifugação do meio de cultivo em células utilizadas como controle e células exposta a DT1 por 24 horas foram mantidas. O objetivo foi o mesmo do ensaio anterior, detectar epítomos conformacionais, porém estes ao serem incubados com anticorpo para a detecção de VE-caderina e anticorpo secundário correspondente (*anti-rabbit*) não apresentaram nenhuma marcação.

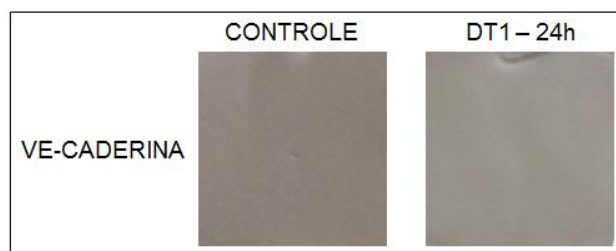


FIGURA 19 – *DOT BLOT* DO SEDIMENTO OBTIDO POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO APLICADO PARA O ISOLAMENTO DE MICROVESÍCULAS. O sedimento resultante da aplicação da ultracentrifugação no meio de cultivo de células utilizadas como controle e exposta a DT1 por 24 horas foram analisados quanto a presença de VE-caderina.

## 5 DISCUSSÃO

O loxoscelismo é o termo utilizado para caracterizar as manifestações clínicas decorrentes do envenenamento após acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles* (aranha-marrom) (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004). A principal característica clínica da picada da aranha-marrom é o desenvolvimento de uma lesão dermonecrótica com típico espalhamento gravitacional a partir do local de inoculação do veneno que pode ainda ser acompanhada por um quadro sistêmico, incluindo fraqueza, vômitos, febres, distúrbios hematológicos e insuficiência renal. O loxoscelismo sistêmico é o quadro de maior gravidade, porém menos comum (DA SILVA *et al.*, 2004).

Dados histopatológicos de pele de coelho expostos experimentalmente ao veneno de *L. intermedia* mostraram degeneração da parede dos vasos sanguíneos, citotoxicidade endotelial e formação de redes de fibrina e trombo (VEIGA *et al.*, 2001b; ZANETTI *et al.*, 2002). Do mesmo modo, foi observado hiperpermeabilidade vascular e infiltração de leucócitos polimorfonucleares em torno dos vasos sanguíneos provocando uma resposta inflamatória maciça em resposta as toxinas veneno (VEIGA *et al.*, 2001b). Além disso, ao avaliar a ação do veneno total de *L. intermedia* sobre células endoteliais de aorta de coelho (linhagem RAEC) foi evidenciado o depósito do veneno sobre a superfície das células, indicando que toxinas do veneno interagem diretamente com o endotélio vascular (PALUDO *et al.*, 2006; APPEL *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2011a).

O uso de técnicas da biologia molecular permitiram a caracterização de diversas isoformas de fosfolipases-D no veneno de diferentes espécies, mostrando que as mesmas possuem um alto nível de identidade (KALAPOTHAKIS, 2007). O interesse pela fosfolipases, além de suas atividades biológicas, se deve ao fato de que aproximadamente 20,2 % dos transcritos encontrados na glândula produtora de veneno de *L. intermedia* codificam para estas proteínas (GREMSKI *et al.*, 2010).

A partir a obtenção das fosfolipases-D recombinantes foram realizados ensaios de atividade biológica mostrando que as mesma quando estudadas isoladamente são capazes de induzir a maioria dos efeitos observados com o veneno total. Como dermonecrose, principal característica induzida pela enzima que permite chama-la também de toxina dermonecrótica, aumento da permeabilidade vascular, resposta inflamatória no local de inoculação e em nível sistêmico, agregação

plaquetária, hemólise e nefrotoxicidade (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; TAMBOURGUI *et al.*, 2010).

Estudos ainda mostram que a LiRecDT1 é capaz de interagir com a membrana de células de linhagens tumorais e eritrócitos promovendo o aumento de influxo de cálcio pelas célula. O aumento do cálcio intracelular ocorre de modo tempo dependente além de depender, provavelmente, da quantidade de canais de cálcio expressos na célula (WILLE *et al.*, 2013; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011). Sugere-se também que esse aumento é dependente da atividade catalítica da LiRecDT1 devido sua capacidade de hidrolisar fosfolipídios de membrana, principalmente lisofosfatidilcolina e esfingomiélin liberando como subproduto ácido lisofosfatídico e ceramida-1-fosfato, respectivamente, e colina. Esses lipídios são moléculas bioativas responsáveis por modular diferentes atividades biológicas.

O ácido lisofosfatídico liga-se a receptores acoplados a proteína G e sinaliza para diferentes respostas biológicas como proliferação, sobrevivência, migração celular além da remodelação do citoesqueleto e principalmente a mobilização de cálcio. Enquanto a ceramida-1-fosfato é um mediador capaz de gerar cascatas de sinalização que levam à secreção de citocinas e por sua vez o recrutamento de leucócitos, sugerindo assim relação da toxina dermonecrótica a processos inflamatórios (CHAIM *et al.*, 2011a).

Os mecanismos envolvidos na formação de microvesículas não são completamente conhecidos, mas sabe-se que a formação de microvesículas demanda gasto de energia e aumento dos níveis intracelulares de cálcio, responsável por ativar proteases, como a calpaína, que desestabilizam a ancoragem da membrana citoplasmática ao citoesqueleto além de inibir flipases e ativar escramblases resultando em colapso da assimetria fosfolipídica (ZWAAL E SCHROIT, 1997).

E ainda reforçando a hipótese de que este grupo de toxinas induz resposta inflamatória decorrentes de cascatas de sinalização intracelulares, um estudo utilizando a fosfolipase-D recombinante de *L. reclusa* demonstrou que, após expor fibroblastos humanos à toxina, foi verificado o aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, IL-1B, CCL5, CXCL-1, CXCL-2 e TNF- $\alpha$  (DRAGULEV *et al.*, 2007). Relacionando estes dados com os dados obtidos em outro experimento realizados com células endoteliais em cultivo, onde correlacionou-se a liberação de microvesículas com a liberação de IL-6, implicando em uma relação entre a



vesiculação endotelial e as vias inflamatórias clássicas da produção de citocinas (CURTIS *et al.*, 2009).

Portanto, tendo em vista o potencial inflamatório das fosfolipases-D e ainda sua capacidade em induzir o aumento de cálcio intracelular em diferentes linhagens celulares o objetivo do trabalho foi verificar se células endoteliais, que estão diretamente ligadas a respostas inflamatórias, induzem a produção de microvesículas quando expostas a LiRecDT1. Uma vez que a liberação de microvesículas depende do aumento de cálcio intracelular e como já visto a liberação dessas microvesículas pode estar aumentada em doenças inflamatórias.

Dessa forma, a fim de avaliar a liberação de microvesículas por células endoteliais de aorta de coelho (linhagem RAEC) expostas a fosfolipases-D recombinantes, foi necessário primeiramente obter as isoformas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A. Estas foram expressas em cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS e purificadas por cromatografia de afinidade (FIGURA 5 e 6). Após a purificação, as proteínas foram obtidas com grau de pureza, de forma semelhante à Chaim e colaboradores (2006, 2011a), possibilitando a utilização das mesmas para ensaios bioquímicos e biológicos.

Buscando avaliar a atividade das isoformas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A foi realizado ensaio de degradação da esfingomielina visando a detecção indireta da colina utilizando o kit do reagente *Amplex Red*. Após 1 hora de reação, foi possível determinar que a isoforma LiRecDT1 possui alta atividade esfingomielinásica enquanto a isoforma mutada possui apenas atividade residual (FIGURA 7). Estes dados corroboram os resultados obtidos por Chaim e colaboradores (2011a) e permitem a utilização da LiRecDT1 como enzimas dermonecróticas ativas, e da LiRecDT1 H12A como a enzima dermonecróticas com atividade residual para ensaios *in vitro*.

Além disso, foram observadas alterações na morfologia de culturas de células RAEC após a exposição a LiRecDT1 indicando citotoxicidade direta principalmente pela presença de vacúolos citoplasmáticos. Essas alterações foram induzidas de uma maneira tempo-dependente iniciando após 1 hora de exposição (FIGURA 9) e tendendo a aumentar em quantidade de células afetadas e números de vacúolos. A resposta das células RAEC a LiRecDT1 H12A foi tardia, provavelmente, devido a presença apenas de atividade catalítica residual, foi possível verificar que algumas células sofreram vacuolização citoplasmática somente no intervalo de tempo de 24

horas de exposição (FIGURA 13). Efeitos semelhantes foram observados em Chaim e colaboradores (2011a) ao expor células da linhagem RAEC à LiRecDT1, porém nos intervalos de tempos descritos no trabalho não foi possível verificar alterações em células expostas a toxina mutada, por se tratar de um tempo curto de exposição. Os resultados obtidos com o veneno corroboram com dados obtidos por outros autores, uma vez que já foi verificada a desadesão de células endoteliais da matriz extracelular quando expostas ao veneno de *L. intermedia* (VEIGA *et al.*, 2000b; NOWATZKI *et al.*, 2012).

Do mesmo modo, a LiRecDT1 também diminui a viabilidade celular de uma forma dependente da concentração e do tempo, demonstrando ainda uma citotoxicidade direta da toxina (FIGURA 14). Enquanto células expostas a isoforma mutada não apresentaram alterações de viabilidade celular no tempo de 2 horas de exposição, porém é possível verificar uma significativa diminuição da viabilidade após 24 horas de exposição. Esta foi a primeira vez em que foi avaliada a viabilidade celular de células endoteliais de aorta de coelho expostas a LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A. A concentração de veneno a que as vítimas serão expostas após envenenamento depende de fatores como tamanho e sexo das aranhas sendo que o volume injetado contém uma concentração de proteínas que varia de 20 µg a 200 µg de proteínas (SAMS *et al.*, 2001; TAMBOURGI *et al.*, 2010). As baixas concentrações em quais as células foram expostas da LiRecDT1 (5 e 25 µg de toxina) assemelham-se aos níveis de toxina que seriam observados após um envenenamento típico de *Loxosceles*. Já foi demonstrado perda de viabilidade celular em linhagem celular de rim canino expostos a LiRecDT1, estando associado aos efeitos do loxoscelismo e na característica da enzima de provocar nefrotoxicidade (CHAIM *et al.*, 2006).

Microvesiculação de células após exposição a LiRecDT1 foi sugerida inicialmente através da análise ultraestrutural de eritrócitos onde os mesmos quando submetidos a exposição do veneno e a isoforma LiRecDT1 isoladamente apresentaram modificações na superfície da membrana eritrocitária, como exovesiculação, alterações de tamanho e a presença de microesferócitos. Esse efeito foi associado à atividade enzimática das fosfolipases-D, pois não foi possível verificar tais alterações em eritrócitos incubados com a isoforma mutada LiRecDT1 H12A (CHAVES-MOREIRA, 2008). Dessa forma buscou-se avaliar se alterações semelhantes às visualizadas em eritrócitos apresentavam-se também em células endoteliais expostas a LiRecDT1. Devido à qualidade da imagem não

conseguimos alcançar este objetivo, porém é possível verificar a presença de resíduos, que se encontram em maiores quantidades, nas imagens correspondentes as células expostas a toxina em comparação as células controle (FIGURA 15).

Buscando isolar e identificar microvesículas que possivelmente são liberadas de células endoteliais para o meio quando expostas a toxina dermonecrótica, seguiu-se o protocolo de centrifugação diferenciadas citada por autores como Brodsky e colaboradores (2003) e ainda identificação das mesmas através de marcadores de membrana como E-selectina (CD62E) e VE-caderina (CD144). Tal método de identificação foi realizado por citometria de fluxo em Combes e colaboradores (1999), que conseguiu caracterizar micropartículas liberadas por HUVEC em resposta a exposição a TNF- $\alpha$  através da identificação de antígenos de membrana PECAM-1 (CD31), ICAM-1 (CD54) e E-selectina (CD62E). No nosso trabalho não foi possível identificar marcadores de membranas no sedimento das ultracentrifugações (FIGURA - 17), protocolo aplicado para o isolamento de microvesículas, por técnicas de *immunoblotting*, dessa forma questionamos se a quantidade de células não foi suficiente para a identificação de microvesículas para a identificação de proteínas pela técnica de *immunoblotting* aqui aplicada. Porém, tendo em vista referências da literatura como Brodsky e colaboradores (2003) isolaram microvesículas a partir de uma quantidade de células aproximada da utilizada no nosso trabalho ( $\sim 10^8$  células). Outra sugestão seria a realização de um diferente protocolo de extrato celular, para a identificação de marcadores de membranas, sem o uso de sonicação ou utilização do complexo enzimático viocase. Chaim e colaboradores em (2016) realizaram o extrato celular de RAEC onde as células foram desaderidas mecanicamente, ressuspensas em tampão de lise e homogenizadas suavemente. Ainda questiona-se a funcionalidade dos anticorpos, já que com os mesmos não conseguimos identificar marcadores de membrana no extrato celular e ainda não conseguimos testar sua funcionalidade por *dot blotting*, pois obtemos um resultado falso-positivo ao verificar que revelando as membranas somente com a incubação dos anticorpos secundários os mesmo reconheceram conteúdo do extrato celular sem a marcação com o primeiro anticorpo.

Para os próximos estudos que visam identificação da liberação de microvesículas por células endoteliais em sinais de exposição a toxina dermonecrótica, novos protocolos de centrifugação diferencial devem ser testados, pois percebemos que a precipitação com TCA revela uma maior quantidade de

proteínas do que o sedimento da ultracentrifugação, bem como a aplicação de outros métodos que busquem identificar as microvesículas, como citometria de fluxo, a utilização do *nanosight* e a utilização de técnicas de microscopia eletrônica para a visualização de *blebs* na membrana plasmática bem como a visualização dos tamanho das microvesículas caso elas realmente estejam sendo liberadas.

## 6 CONCLUSÃO

- LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A foram obtidas na condição solúvel e com alto grau de pureza;
- LiRecDT1 apresentou alta atividade esfingomielinásica enquanto a LiRecDT1 H12A apresentou atividade esfingomielinásica residual;
- A LiRecDT1 promoveu vacuolização citoplasmática na primeira hora de exposição enquanto a isoforma mutada provocou vacuolização após 24 horas;
- No ensaio por MTT houve redução da viabilidade em células exposta a LiRecDT1 logo na segunda hora, já no tempo de 24 horas tanto a LiRecDT1 quanto a LiRecDT1 H12A provocaram perda de viabilidade celular;
- Na análise ultraestrutural as células exposta a LiRecDT1 apresentaram fragmentos superiores à aqueles apresentados por células controles;
- Não foi possível identificar marcadores de membrana nos protocolos aplicados para identificação de MVs, bem como no extrato celular, com exceção da caveolina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPEL, M. H., DA SILVEIRA, R. B., CHAIM, O. M., PALUDO, K. S., SILVA, D. T., CHAVES, D. M., DA SILVA, P. H., MANGILI, O. C., SENFF-RIBEIRO, A., GREMSKI, W., NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochim Biophys Acta**. v. 1780, p. 167-178, 2008.

APPEL, M.H.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, G.; VEIGA, S.S. Insights into brown spider and loxoscelism. **Invertebrate Survival Journal**, v. 2, p. 52-158, 2005.

BARBARO, K. C., KNYSACK, I., MARTINS, R., HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**. v. 45, p. 489-499, 2005.

BARBARO, K.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Adjuvant effect of *Loxosceles gaucho* (South American brown spider) venom. **Toxicon**, v. 32, p. 687-693, 1994.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, United States, v.72, p.248-254, 1976.

BRODSKY, S. V; ZHANG F.; NASJLETTI A.; GOLIGORSKY M.S. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. **Ajp: Heart and Circulatory Physiology**, v. 286, p.1910-1915, 2004

BUONASSISI, V. Sulfated mucopolysaccharide synthesis and secretion in endothelial cell cultures. **Exp Cell Res**. v. 76, p. 363-368, 1973.

CARANDINI T.; COLOMBO F.; FINARDI A.; CASELLA G.; GARZETTI L., VERDERIO C.; FURLAN R. Microvesicles: What is the Role in Multiple Sclerosis?. **Frontiers In Neurology**. v. 6, p.1-7, 2015.

CHAIM, O. M., DA SILVEIRA, R. B., TREVISAN-SILVA, D., FERRER, V. P., SADE, Y. B., BOIA-FERREIRA, M., GREMSKI, L. H., GREMSKI, W., SENFF-RIBEIRO, A., TAKAHASHI, H. K., TOLEDO, M. S., NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochim Biophys Acta**. v. 1811, p. 84-96, 2011a.

CHAIM, O. M., SADE, Y. B., DA SILVEIRA, R. B., TOMA, L., KALAPOTHAKIS, E., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., VON DIETRICH, C. P., NADER, H. B.; SANCHES VEIGA, S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**. v. 211, p. 64-77, 2006.

CHAIM, O. M., TREVISAN-SILVA, D., CHAVES-MOREIRA, D., WILLE, A. C., FERRER, V. P., MATSUBARA, F. H., MANGILI, O. C., DA SILVEIRA, R. B., GREMSKI, L. H., GREMSKI, W., SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. **Toxins (Basel)**. v. 3,

p. 309-344, 2011b.

CHAVES-MOREIRA, D. Estudo da atividade hemolítica do veneno de *Loxosceles intermedia* (aranha marrom) e seus mecanismos moleculares. 2008. 167 f. dissertação (Mestrado em Biologia celular e molecular) –Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Paraná.

CHAVES-MOREIRA, D., CHAIM, O. M., SADE, Y. B., PALUDO, K. S., GREMSKI, L. H., DONATTI, L., DE MOURA, J., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., DA SILVEIRA, R. B., SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **J Cell Biochem.** v. 107, p. 655-666, 2009.

CHAVES-MOREIRA, D., SOUZA, F. N., FOGACA, R. T., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., SENFF-RIBEIRO, A., CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. **J Cell Biochem.** v. 112, p. 2529-2540, 2011.

COCUCCI, E., RACCHETTI, G.; MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends Cell Biol.** v. 19, p. 43-51, 2009.

COMBES V.; SIMON A.C.; GRAU G.E.; ARNOUX D.; CAMOIN L.; SABATIER F.; MUTIN M.; SANMARCO M.; SAMPOL J.; DIGNAT-GEORGE F. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 104, p.93-102, 1999.

CURTIS A.M.; WILKINSON P.F.; GUI M., GALES T.L.; HU E.; EDELBERG J.M. P38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles. **Journal Of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, p.701-709, 2009.

DA SILVA, P. H., DA SILVEIRA, R. B., APPEL, M. H., MANGILI, O. C., GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon.** v. 44, p. 693-709, 2004.

DA SILVEIRA, R. B., DOS SANTOS FILHO, J. F., MANGILI, O. C., VEIGA, S. S., GREMSKI, W., NADER, H. B.; VON DIETRICH, C. P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon.** v. 40, p. 815-822, 2002.

DA SILVEIRA, R. B., PIGOZZO, R. B., CHAIM, O. M., APPEL, M. H., DREYFUSS, J. L., TOMA, L., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., DIETRICH, C. P., NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. **Biochimie.** v. 88, p. 1241-1253, 2006.

DA SILVEIRA, R. B., PIGOZZO, R. B., CHAIM, O. M., APPEL, M. H., SILVA, D. T., DREYFUSS, J. L., TOMA, L., DIETRICH, C. P., NADER, H. B., VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. **Biochimie.** v. 89, p. 289-300, 2007.

DE CASTRO, C. S., SILVESTRE, F. G., ARAUJO, S. C., GABRIEL DE, M. Y., MANGILI, O. C., CRUZ, I., CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**. v. 44, p. 273-280, 2004.

DIGNAT-GEORGE, F.; BOULANGER, C. M. The Many Faces of Endothelial Microparticles. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, v. 31, p.27-33, 2010.

DRAGULEV, B., BAO, Y., RAMOS-CERRILLO, B., VAZQUEZ, H., OLVERA, A., STOCK, R., ALGARON, A.; FOX, J. W. Upregulation of IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2 dominates gene expression in human fibroblast cells exposed to *Loxosceles reclusa* sphingomyelinase D: insights into spider venom dermonecrosis. **J Invest Dermatol**. v. 127, p. 1264-1266, 2007.

FEITOSA, L., GREMSKI, W., VEIGA, S. S., ELIAS, M. C., GRANER, E., MANGILI, O. C.; BRENTANI, R. R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**. v. 36, p. 1039-1051, 1998.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **Am J Med Sci**. v. 304, p. 261-267, 1992.

GALINDO-HERNANDEZ, O., VILLEGAS-COMONFORT, S., CANDANEDO, F., GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, M.C., CHAVEZ-OCAÑA, S., JIMENEZ-VILLANUEVA, X., SIERRA-MARTINEZ, M., SALAZAR E.P. Elevated Concentration of Microvesicles Isolated from Peripheral Blood in Breast Cancer Patients. **Archives Of Medical Research**, v. 44, n. 3, p.208-214, abr. 2013.

GIUSEPPE, P. O.; ULLAH, A.; TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L. H.; WILLW, A. C. M.; CHAVES-MOREIRA, D.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; MURAKAMI, M. T.; VEIGA, S.S.; ARNI, R. K.; Structure of a novel class II phospholipase D: Catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 409, p. 622- 627, 2011.

GREMSKI, L. H., DA SILVEIRA, R. B., CHAIM, O. M., PROBST, C. M., FERRER, V. P., NOWATZKI, J., WEINSCHUTZ, H. C., MADEIRA, H. M., GREMSKI, W., NADER, H. B., SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Mol Biosyst**. v. 6, p. 2403-2416, 2010.

GREMSKI, L. H., TREVISAN-SILVA, D., FERRER, V. P., MATSUBARA, F. H., MEISSNER, G. O., WILLE, A. C., VUITIKA, L., DIAS-LOPES, C., ULLAH, A., DE MORAES, F. R., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., BARBARO, K. C., MURAKAMI, M. T., ARNI, R. K., SENFF-RIBEIRO, A., CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**. v. 83, p. 91-120, 2014.

HOGAN, C. J., BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Ann Emerg Med**. v. 44, p. 608-624, 2004.



HOUBEN, A. J., MOOLENAAR. Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. **Cancer Metastasis Rev.** v.30, p. 557-565, 2011.

HUANG, P., BI, J., OWEN, G.R., CHEN, W., ROKKA, A., KOIVISTO, L., HEINO, J., HÄKKINEN, L., LARJAVA H. Keratinocyte Microvesicles Regulate the Expression of Multiple Genes in Dermal Fibroblasts. **Journal Of Investigative Dermatology**, v. 135, p.3051-3059, 2015.

ISBISTER, G. K.; FAN, H. W. Spider bite. **Lancet.** v. 378, p. 2039-2047, 2011.

KALAPOTHAKIS, E., CHATZAKI, M., GONCALVES-DORNELAS, H., DE CASTRO, C. S., SILVESTRE, F. G., LABORNE, F. V., DE MOURA, J. F., VEIGA, S. S., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., GRANIER, C.; BARBARO, K. C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom. **Toxicon**, v. 50, p. 938-946, 2007.

KUSMA, J., CHAIM, O. M., WILLE, A. C., FERRER, V. P., SADE, Y. B., DONATTI, L., GREMSKI, W., MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie.** v. 90, p. 1722-1736, 2008.

LEE, D. G., JEON, J. H., JANG, M. K., KIM, N. Y., LEE, J. H., KIM, S. J., KIM, G. D. e LEE, S. H. Screening and characterization of a novel fibrinolytic metalloprotease from a metagenomic library. **Biotechnol Lett.** v. 29, p. 465-472, 2007.

LEE, S.; LYNCH, K. R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochem J.** v. 391, p. 317-323, 2005.

LEROYER A.S.; ANFOSSO F.; LACROIX R.; SABATIER F.; SIMONCINI S.; NJOCK S. M.; JOURDE N.; BRUNET P.; CAMOIN-JAUL. ; SAMPOL J.; DIGNAT-GEORGE F. Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. **Thrombosis And Haemostasis**, v. 104, p.456-463, 2010.

MALAQUE, C. M., SANTORO, M. L., CARDOSO, J. L., CONDE, M. R., NOVAES, C. T., RISK, J. Y., FRANCA, F. O., DE MEDEIROS, C. R.; FAN, H. W. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon.** v. 58, p. 664-671, 2011.

MÁLAQUE, C.M.S.; CASTRO-VALENCIA, J.E.; CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; BARBARO, K.C.; FAN, H.W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo**, Brazil, v. 44, p.139-143, 2002.

MAUSE, S. F.; WEBER, C. Microparticles: Protagonists of a Novel Communication Network for Intercellular Information Exchange. **Circulation Research**, v. 107, p.1047-1057, 2010.

MURAKAMI, M. T., FERNANDES-PEDROSA, M. F., DE ANDRADE, S. A., GABDOULKHAKOV, A., BETZEL, C., TAMBOURGI, D. V.; ARNI, R. K. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary

relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 342, p. 323-329, 2006.

MURAKAMI, M.T.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; TAMBOURGI, D.V.; ARNI, R.K. Structural Basis for Metal-Ion Coordination and the Catalytic Mechanism of Sphingomyelinases D. **J Biol Chem**, v. 280, p. 13658-13658, 2005.

NOWATZKI, J., DE SENE, R. V., PALUDO, K. S., VEIGA, S. S., OLIVER, C., JAMUR, M. C., NADER, H. B., TRINDADE, E. S.; FRANCO, C. R. Brown spider venom toxins interact with cell surface and are endocytosed by rabbit endothelial cells. **Toxicon.** v. 56, p. 535-543, 2010.

PALUDO, K. S., GREMSKI, L. H., VEIGA, S. S., CHAIM, O. M., GREMSKI, W., DE FREITAS BUCHI, D., NADER, H. B., DIETRICH, C. P.; FRANCO, C. R. The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. **Toxicon.** v. 47, p. 844-853, 2006.

PEREZ-CASAL, M.; DOWNEY C.; FUKUDOME K.; MARX G.; TOH C.H. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. **Blood**,v. 105, p.1515-1522, 2005.

PETTUS, B. J., BIELAWSKA, A., SPIEGEL, S., RODDY, P., HANNUN, Y. A.; CHALFANT, C. E. Ceramide kinase mediates cytokine- and calcium ionophore-induced arachidonic acid release. **J Biol Chem.** v. 278, p. 38206-38213, 2003.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **The Journal Of Cell Biology**, v. 200, p.373-383, 2013

RIBEIRO, R. O., CHAIM, O. M., DA SILVEIRA, R. B., GREMSKI, L. H., SADE, Y. B., PALUDO, K. S., SENFF-RIBEIRO, A., DE MOURA, J., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., GREMSKI, W., NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon.** v. 50, p. 1162-1174, 2007.

SABATIER, F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. **Blood**,, v. 99, p.3962-3970, 2002.

SAMS, H.H.; HEARTH, S.B.; LONG, L.L.; WILSON, D.C.; SANDERS, D.H.; KING, L.E. Nineteen documented cases of *Loxosceles reclusa* envenomation. **Journal of the american academy of dermatology**, United States, v.44, p.603-608, 2001.

SZOTOWSKI B.; ANTONIAK S.; GOLDIN-LANG P.; TRAN Q.V.; PELS K.; ROSENTHAL P.; BOGDANOV V.Y.; BORCHERT H.H.; SCHULTHEISS H.P.; RAUCH U. Antioxidative treatment inhibits the release of thrombogenic tissue factor from irradiation- and cytokine-induced endothelial cells. **Cardiovascular Research**, v. 73, p.806-812, 2007.

TAMBOURGI, D. V., GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M.; VAN DEN BERG, C. W. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon.** v. 56, p.

1113-1119, 2010.

VEIGA, S. S., DA SILVEIRA, R. B., DREYFUS, J. L., HAOACH, J., PEREIRA, A. M., MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**. v. 38, p. 825-839, 2000a.

VEIGA, S. S., FEITOSA, L., DOS SANTOS, V. L., DE SOUZA, G. A., RIBEIRO, A. S., MANGILI, O. C., PORCIONATTO, M. A., NADER, H. B., DIETRICH, C. P., BRENTANI, R. R.; GREMSKI, W. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. **Histochem J**. v. 32, p. 397-408, 2000b.

VEIGA, S. S., ZANETTI, V. C., BRAZ, A., MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Braz J Med Biol Res**. v. 34, p. 843-850, 2001a.

VEIGA, S. S., ZANETTI, V. C., FRANCO, C. R., TRINDADE, E. S., PORCIONATTO, M. A., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thromb Res**. v. 102, p. 229-237, 2001b.

VETTER, R.S.; VISSCHER, P.K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. **International journal of dermatology**, United States, v.37, p.481-496, 1998.

VUITIKA, L.; GREMSKI, L. H.; BELISARIO, M.; CHAVES-MOREIRA, D.; FERRER, V. P.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Identification, cloning and functional characterization of a novel phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom containing a conservative mutation (D233E) in the catalytic site. **J Cell Biochem**, v. 114, p. 2479-2492, 2013.

WILLE, A. C., CHAVES-MOREIRA, D., TREVISAN-SILVA, D., MAGNONI, M. G., BOIA-FERREIRA, M., GREMSKI, L. H., GREMSKI, W., CHAIM, O. M., SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Modulation of membrane phospholipids, the cytosolic calcium influx and cell proliferation following treatment of B16-F10 cells with recombinant phospholipase-D from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**. v. 67, p. 17-30, 2013.

YOUNG, A. R.; PINCUS, S. J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon**. v. 39, p. 391-400, 2001.

ZANETTI, V.C.; da SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, England, v. 13, p.135-148, 2002.

ZWAAL R.F., SCHROIT A.J., Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. **Blood**. v. 89, p. 1121-1132. 1997.